

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Bioquímica

**La fosfatasa SHIP-1 se asocia al hemITAM
de Dectin-1 y modula respuestas
funcionales frente a *Candida albicans* en
células dendríticas**

TESIS DOCTORAL

Noelia Blanco Menéndez

Madrid, 2014

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid



La fosfatasa SHIP-1 se asocia al hemITAM de Dectin-1 y modula respuestas funcionales frente a *Candida albicans* en células dendríticas

Memoria presentada por la licenciada en Biología:

Noelia Blanco Menéndez

Para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de tesis:

Dr. David Sancho Madrid

Dr. Carlos del Fresno Sánchez

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de Inmunobiología de la Inflamación, en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares





MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



Los Doctores David Sancho Madrid, Investigador Principal, y Carlos del Fresno Sánchez, Postdoctoral senior en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

CERTIFICAN

que D^a Noelia Blanco Menéndez, Licenciada en Biología por la Universidad de Santiago de Compostela y Máster en Microbiología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: La fosfatasa SHIP-1 se asocia al hemITAM de Dectin-1 y modula respuestas funcionales frente a *Candida albicans* en células dendríticas.

Revisado el presente trabajo, expresamos nuestra conformidad para la presentación del mismo en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a su evaluación ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctora en Biociencias Moleculares por la Universidad Autónoma de Madrid

Dr. David Sancho Madrid
Investigador Principal CNIC

Dr. Carlos del Fresno Sánchez
Postdoctoral Senior, CNIC

Imagen de portada: tinción PAS/hematoxilina de células dendríticas de ratón infectadas con *C. albicans*.

A mis padres, mi hermana y Pablo

***“Un científico debe tomarse la libertad de
plantear cualquier cuestión,
de dudar de cualquier afirmación,
de corregir errores”***

Julius Robert Oppenheimer
Físico estadounidense (1904-1967)

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Parece mentira que después de escribir la tesis, uno no sabe ni siquiera por dónde empezar al llegar a los agradecimientos. Aun así, intentaré no dejarme a nadie en el tintero.

Desde que tengo uso de razón siempre he querido dedicarme a esto. Y ahora, al volver la vista atrás recuerdo mi llegada a Madrid hace 7 años, dejando muchas cosas atrás y con una maleta cargada de sueños. Y haciendo balance de estos casi cinco años que ha durado esta tesis, puedo decir que ha sido una etapa dura, en ocasiones llena de tremendas desilusiones, pero también acompañada de alegrías y satisfacciones. Una etapa que me ha ayudado a formarme y madurar como persona y como científica y que me ha enseñado que casi todo puede lograrse con ilusión, constancia y esfuerzo.

Precisamente a mis padres y mi hermana les debo gran parte de lo que soy hoy en día. Ellos me han ayudado, apoyado y han estado siempre a mi lado, enseñándome y corrigiéndome, transmitiéndome sus valores. Tengo tantísimas cosas que agradecerlos, que sería imposible intentar plasmarlas aquí. Gracias por animarme a perseguir mis sueños, por confiar siempre en mí y por animarme cada día a no tirar nunca la toalla. Gracias por ser los mejores padres y hermana que alguien puede desear tener. Esta tesis es por y para vosotros y también para la abuela, que aunque por unos meses no podrá verme defenderla, sé que estaría muy orgullosa.

Esta tesis también es para ti Pablo, por ser mi compañero ideal de viaje, por tu paciencia y comprensión durante todo este tiempo. Quizás tu eres el que más ha sufrido mis altibajos, las infinitas horas en el laboratorio incluidos los fines de semana, los viajes para buscarme cuando salía tarde, los seminarios, etc. Gracias por entenderme, por escucharme y por estar siempre a mi lado. Aunque diese la vuelta al mundo, no encontraría un compañero de viaje mejor que tú para comenzar esta nueva etapa llena de ilusiones.

Gracias también a todas aquellas personas con las que he compartido estos años de trabajo y experiencias en el laboratorio. A mis compañeros, especialmente a María, mi compañera incansable de fatigas desde el inicio de esta aventura. También a Ruth y Sarai. Sin vosotras chicas, muchas veces este camino se habría

hecho cuesta arriba. Gracias por vuestra ayuda y los momentos de risas dentro y fuera del laboratorio. Gracias también a Salva y a Laura, por dejarme aprender de vosotros y ayudarme siempre que ha estado en vuestra mano. También por los buenos ratos que hemos pasado juntos. Gracias a todos vosotros por ser compañeros y amigos.

Tengo también que agradecer haberme tropezado en el camino de la ciencia contigo CARLITOS. Gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo, por enseñarme todo lo que sabes y más. Por transmitirme todos y cada uno de los días ese positivismo tuyo y hacerme sonreír. Por tu amistad, por darme cariño y también algún tirón que otro de orejas algunas veces merecido. Aunque has llegado un poquito tarde, la verdad es que ha sido un placer trabajar codo con codo contigo. Ojalá hubieses estado desde el principio, porque además de ser un buen científico y buen profesor eres todavía mejor persona.

También mencionar a la gente de la segunda planta norte, especialmente a los PACOS, con los que inicie esta experiencia en el CNIC. Especialmente gracias a Giulia, con la que he compartido tantos buenos momentos, que me ha enseñado tantas cosas y a la que echo tanto de menos ahora que no está. También a Cris, Vera, M^a Laura y José María, por todas las veces que me habéis echado una mano y a la gente que ya no está en el labo, Jaime, Elena Giulia, Adela y Jose. En vosotros encontré grandes compañeros y amigos.

Y por supuesto, gracias a David. Por darme la oportunidad de ser la primera en formar parte de su laboratorio y poner a mi alcance todos los medios para poder realizar esta tesis, aprender cada día y formarme como científica.

RESUMEN

RESUMEN

Dectin-1 (CLEC7A) es un receptor lectina tipo C (CLR) que reconoce β 1-3 glucanos presentes en la superficie de hongos patógenos oportunistas como *Candida albicans*. Tras la detección de su ligando, Dectin-1 une Syk a través de la tirosina 15 fosforilada del motivo hemITAM presente en su dominio citoplasmático y desencadena diferentes respuestas como fagocitosis, activación de rutas de señalización y factores de transcripción y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Aunque la mayoría de estos eventos de señalización son mediados por Syk, la contribución de otros módulos de señalización temprana apenas se ha estudiado. De cara a profundizar en ese estudio, exploramos las proteínas que interaccionaban con la cola intracelular de Dectin-1 tras su activación en células dendríticas (DCs). Encontramos que la fosfatasa SHIP-1 es una de las proteínas más representadas en la unión a la tirosina 15 fosforilada de Dectin-1.

Tras la estimulación de DCs deficientes en SHIP-1, procedentes de ratones CD11c Δ SHIP-1, con *C. albicans* muerta por calor (HKC), observamos un aumento en la fosforilación de Syk, pero otras vías de señalización por debajo de Syk y respuestas funcionales como activación de MAPKs, NF- κ B o NFAT, o producción de citoquinas no se ven afectadas. Sin embargo, la ausencia de SHIP-1 resultó en una mayor producción de ROS en DCs tratadas con HKC, que correlacionaba con una mayor actividad candidicida de estas DCs contra *C. albicans* viva. Ambos efectos son dependientes de Dectin-1, Syk y NADPH oxidasa.

Estos resultados revelan una señalización compleja en CLR que contienen motivos hemITAM, los cuales podrían ser sutilmente regulados mediante un balance de efectores y represores acoplados al hemITAM de manera temprana.

SUMMARY

SUMMARY

Dectin-1 (CLEC7A) is a C-type lectin receptor that recognizes β 1-3 glucans on the surface of opportunistic fungal pathogens such as *Candida albicans*. Upon ligand binding, Dectin-1 binds Syk through phosphorylated tyrosine15 in its hemITAM motif present in the cytoplasmic domain and triggers different responses such as phagocytosis, activation of signaling pathways, transcription factors and reactive oxygen species (ROS) production.

Although Syk mediates most of these signaling events, the contribution of additional early signaling modules remains poorly explored. To address this question, we explored the interactome of Dectin-1 intracellular tail in dendritic cells (DCs). We found that the phosphatase SHIP-1 is one of the most represented proteins binding to the phosphorylated tyrosine 15 present in the hemITAM of Dectin-1.

Following stimulation of SHIP-1 deficient DCs, from CD11c Δ SHIP-1 mice, with heat-killed *C. albicans* (HKC), we observed an increase in Syk phosphorylation, but other signaling pathways downstream Syk and functional responses such as MAPKs, NF- κ B or NFAT activation, or cytokine production were unaffected. However, the absence of SHIP-1 resulted in enhanced ROS production by HKC-treated DCs, correlating with increased killing activity against live *C. albicans*. Both effects are dependent on Dectin-1, Syk and NADPH oxidase.

These results reveal a complex signaling in CLRs containing hemITAM motifs, which could be subtly regulated by the balance of early effectors and regulators coupled to the hemITAM.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	17
SUMMARY	21
LISTADO DE FIGURAS	31
LISTADO DE TABLAS.....	37
ABREVIATURAS	41
1.-INTRODUCCIÓN	45
1.1- Sistema inmune.....	45
1.2- Inmunidad innata.	45
1.2. a) Componentes celulares del sistema inmunitario innato.	46
1.2. b) Células dendríticas (DCs).....	46
1.2. c) Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y receptores de reconocimiento (PRRs).....	48
1.2. d) Receptores de lectina tipo C (CLRs).....	49
1.2. d. i) Clasificación de los CLR según su motivo de señalización intracelular.	50
1.3- Dectin-1 (CLEC7A).	52
1.3.a) Descripción, estructura y expresión de Dectin-1.	53
1.3.b) Ligandos, señalización y respuestas controladas por Dectin-1.....	53
1.3. c) Función de Dectin-1 en el control de la infección fúngica.....	56
1.4- <i>Candida albicans</i>.....	57
1.4.a) Morfología de <i>C. albicans</i> : relación entre dimorfismo y virulencia.....	58
1.4.b) Estructura de la pared celular.....	58
1.5- SHIP-1	60
1.5.a) Descripción, estructura y expresión de SHIP-1	60
1.5.b) Fenotipo de ratones deficientes en SHIP-1.....	62
1.5.c) Función biológicas y mecanismo de acción de SHIP-1.....	63

2.-OBJETIVOS	67
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	71
3.1- Reactivos.	71
3.1. a) <i>Candida albicans</i>	71
3.1.b) Ratones.....	71
3.1.c) Inhibidores.....	72
3.2- Estudios de proteómica.....	72
3.3- Generación de transfectantes transitorios en células CHO-K1.....	73
3.3.a) Clonaje de Dectin-1 WT Y Dectin-1 Y15F en pmCherry-C1.....	73
3.3.b) Clonaje de SHIP-1 en pEGFP-N1.....	73
3.3.c) Clonaje de Syk en pEGFP-N1.....	74
3.3.d) Transfección transitoria en células CHO-K1 para microscopía confocal.....	74
3.3.e) Adquisición de imágenes en microscopio confocal y análisis.	74
3.4- Obtención de DCs derivadas de médula ósea (BMDCs) y caracterización mediante citometría de flujo.....	75
3.5- Ensayos de fagocitosis.	76
3.6- Inmunofluorescencias.	76
3.7- Ensayos bioquímicos analizados por <i>western blot</i>.	77
3.8- PCR cuantitativa.....	78
3.9- Estimulación y análisis de secreción de citoquinas mediante ELISA.	78
3.10- Detección de especies reactivas del oxígeno (ROS).	79
3.11- Ensayos de eliminación de <i>C. albicans</i> por DCs.	79
3.11.a) Unidades formadoras de colonias.....	79
3.11.b) MTT.....	80
3.11.c) PAS / Hematoxilina.....	80
3.12- Modelos de Infección <i>in vivo</i> con <i>C. albicans</i>.....	81
3.12.a) Modelo de candidiasis sistémica.....	81
3.12.b) Modelo de inyección intraperitoneal con <i>C. albicans</i> o Curdlan.....	81

3.13- Análisis estadísticos.....	81
4.- RESULTADOS	85
4.1-Estudio del proteoma que interacciona con el dominio intracelular de Dectin-1.	85
4.2- Estudio de la unión directa de SHIP-1 a Dectin-1 tras su activación.	87
4.2.a) Estudio de la unión entre SHIP-1 recombinante y el dominio citoplasmático de Dectin-1.....	87
4.2.b) Análisis de la unión entre SHIP-1 y Dectin-1 en transfectantes transitorios generados en células CHO-K1.....	88
4.3- Estudio del papel funcional de SHIP-1 en respuesta a ligandos específicos de Dectin-1 en DCs.....	92
4.3.a) Generación de ratones CD11cΔSHIP-1 para el estudio del papel de SHIP-1 en DCs.....	92
4.3.b) Generación y caracterización de DCs derivadas con GM-CSF a partir de médula ósea de ratones CD11cΔSHIP-1.....	93
4.3.c) Análisis del papel de SHIP-1 en la fagocitosis de <i>C. albicans</i> mediada por Dectin-1.....	95
4.3.d) Estudio de la relocalización de SHIP-1 endógeno alrededor de ... fagosomas tras la fagocitosis de <i>C. albicans</i>	96
4.3.e) Análisis de la fosforilación de Syk mediada por Dectin-1 en ausencia de SHIP-1 en DCs.....	97
4.3.f) Análisis de la activación de MAPKs, de los factores de transcripción NF-κB y NFAT y de la producción de citoquinas en respuesta a <i>C. albicans</i> en DCs deficientes en SHIP-1.....	100
4.3.g) Análisis de los niveles de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidos vía Dectin-1-Syk en ausencia de SHIP-1 en DCs.	102
4.3.h) Estudio de la implicación de SHIP-1 en la actividad candidicida de DCs.....	105
4.4- Implicación de SHIP-1 en la infección in vivo por <i>C. albicans</i>.....	107
4.4.a) Modelo de candidiasis sistémica.....	107
4.4.b) Modelo de infección intraperitoneal con <i>C. albicans</i>	108
4.4.c) Modelo de inflamación intraperitoneal con Curdlan.....	109

5.- DISCUSIÓN	115
6.- CONCLUSIONES	129
7.- BIBLIOGRAFÍA	133
8.- ANEXOS.....	149
Anexo 1. Análisis de viabilidad de GM-DCs en respuesta a diferentes de inhibidores químicos.	149
Anexo 2. Tabla completa de proteínas (CD-ROM).....	151
Anexo 3. Video 1 (CD-ROM).....	151
Anexo 4. Video 2 (CD-ROM).....	151
Anexo 5. Video 3 (CD-ROM).....	151
Anexo 6. Video 4 (CD-ROM).....	151
Anexo 7. Producción de ROS en GM-DCs WT y deficientes en SHIP-1 en respuesta a distintos ratios HKC: DC.....	153

LISTADO DE FIGURAS

LISTADO DE FIGURAS

Figura I1. Distribución de poblaciones de células dendríticas.	47
Figura I2. Clasificación de CLRs mieloides por sus motivos de señalización.....	51
Figura I3. Dectin-1 como modelo de CLR acoplado a hemITAM.....	55
Figura I4. Estructura de la pared celular de <i>C. albicans</i>	59
Figura I5. Función y estructura de SHIP.	61
Figura I6. Funciones biológicas de SHIP-1.	64
Figura R1. Diseño experimental para análisis del proteoma reclutado por el dominio citoplasmático de Dectin-1.	85
Figura R2. Análisis de una representación de proteínas que interaccionan con el dominio citoplasmático de Dectin-1 mediante <i>WB</i>	87
Figura R3. Análisis de interacción entre SHIP-1 recombinante y Dectin-1.	88
Figura R4. Estudio de colocalización de SHIP-1 y Dectin-1 en transfectantes transitorios.	89
Figura R5. Análisis del índice de enriquecimiento de SHIP-1 o Syk en la región del receptor Dectin-1.	91
Figura R6. Caracterización de algunas poblaciones linfoides y mieloides en ratones CD11cΔSHIP-1.	93
Figura R7. Caracterización de DCs deficientes en SHIP-1 derivadas de médula ósea con GM-CSF.....	94
Figura R8. Análisis de fagocitosis en DCs deficientes en SHIP-1.	96
Figura R9. Análisis de colocalización de SHIP-1 y Dectin-1 en GM-DCs.....	97

Figura R10. Análisis por inmunofluorescencia de la fosforilación de Syk en GM-DCs expuestas a HKC.	98
Figura R11. Análisis por citometría de flujo de fosforilación de Syk mediada por Dectin-1 en GM-DCs.	99
Figura R12. Análisis por WB de fosforilación de Syk mediada por Dectin-1 en CD11cΔSHIP-1.	99
Figura R13. Activación de MAPK y NF-κB mediada por Dectin-1 en DCs deficientes en SHIP-1.	100
Figura R14. Activación de NFAT mediada por Dectin-1 en DCs deficientes en SHIP-1...	101
Figura R15. Producción de citoquinas en GM-DCs en respuesta a HKC.	101
Figura R16. Producción de IL-1β en GM-DCs en respuesta a HKC o <i>C. albicans</i> viva...	102
Figura R17. Producción de ROS mediada por Dectin-1/Syk en GM-DCs deficientes en SHIP-1.	103
Figura R18. Análisis de activación de la NADPH oxidasa mediada por Dectin-1/Syk en DCs deficientes en SHIP-1.	104
Figura R19. Estudio de la capacidad candidicida de GM-DCs deficientes en SHIP-1.....	105
Figura R20. Estudio del papel de Dectin-1/Syk/NADPH oxidasa en la capacidad candidicida de DCs deficientes en SHIP-1.	106
Figura R21. Modelo <i>in vivo</i> de candidiasis sistémica en ratones CD11cΔSHIP-1.....	108
Figura R22. Modelo de infección intraperitoneal con <i>C. albicans</i> y estudio de respuesta inflamatoria en ratones CD11cΔSHIP-1.....	109
Figura R23. Modelo de inflamación intraperitoneal con Curdlan en ratones heterocigotos para SHIP-1 (SHIP-1 +/-).	110

Figura D1. Hipótesis de competencia entre SHIP-1 y Syk para la unión al hemITAM de Dectin-1.....	120
Figura D2. Hipótesis de unión secuencial de SHIP-1 y Syk para la unión al hemITAM de Dectin-1.....	121
Figura D3. Modelo de señalización vía el heMITAM de Dectin-1 en ausencia de SHIP-1.	123
Anexo 1. Análisis de la viabilidad de GM-DCs en respuesta a diferentes inhibidores químicos.....	149
Anexo 7. Análisis de producción de ROS en respuesta a distintos ratios HKC:DC en GM- DCs deficientes en SHIP-1 y WTs.	153

LISTADO DE TABLAS

LISTADO DE TABLAS

Tabla I1. Principales características de la inmunidad innata y adaptativa.45

Tabla R1. Tabla resumen de quinasas y fosfatasas reclutadas por el dominio
citoplasmático de Dectin-1 mediante espectrometría de masas.....86

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

APC	Célula presentadora de antígeno
Bcl10	Acrónimo de <i>B-cell lymphoma/leukemia 10</i>
BCR	Receptor de linfocitos B
Card9	Proteína 9 que contiene dominio de reclutamiento de caspasa
CFU	Unidades formadoras de colonias
CLEC	Miembro de la familia con dominio de lectinas tipo C
CLR	Receptor de tipo lectina-C
CR3	Receptor 3 del complemento
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
CTLD	Dominio lectina tipo C
DC	Célula dendrítica
DC-SIGN	No-integrina de unión a ICAM-3 específica de DCs
Dectin-1	Lectina tipo C asociada a DCs-1
DPI	Cloruro de difenilen iodonio
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FBS	Suero fetal bovino
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HK	muerta por calor (<i>heat killed</i>)
IE	índice de enriquecimiento
I-κB	Inhibidor de kappa B
IL	Interleuquina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IMGC	Intensidad media de fluorescencia del efector GFP en la célula
IMGR	Intensidad media de fluorescencia del efector GFP en el receptor
ITAM	Motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosina
ITIM	Motivo de inhibición de inmunoreceptor basado en tirosina
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
Lam	Laminarina
Malt1	Gen 1 de translocación del linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MOI	Multiplicidad de infección
MR	Receptor de manosa

MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
Myd88	Gen 88 de respuesta primaria de la diferenciación mieloide
Mφ	Macrófago
NA	Apertura numérica
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NK	Célula natural asesina
NOD	Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
Nφ	Neutrófilo
°C	Grado centígrado
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfatidilinositol 3 kinasa
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
Raf-1	Homólogo I del oncogen viral de la leucemia v-raf-1
RLU	Unidades de luz relativas
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
SH2	Dominio 2 de homología a Src
Syk	Tirosina quinasa del bazo
Tc	Linfocito T colaborador
TCR	Receptor de linfocitos T
Th	Linfocito T colaborador
TLRs	Receptor de tipo <i>Toll</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocito T regulador
WB	<i>Western blot</i>
WT	Silvestre (<i>wild type</i>)

INTRODUCCIÓN

1.-INTRODUCCIÓN

1.1- Sistema inmune.

El sistema inmunitario es un conjunto de células y procesos biológicos que protegen al individuo frente a agentes extraños, principalmente infecciosos, y cuya respuesta coordinada se denomina respuesta inmune. Los componentes que lo forman componen una red elaborada y dinámica que se adapta en el tiempo para reconocer y responder a los patógenos de forma más específica y efectiva, al mismo tiempo que mantienen la tolerancia a lo propio. Durante la respuesta inmune actúan de forma concertada los componentes de la inmunidad innata y adaptativa cuyas principales características se resumen en la tabla I1 (Janeway, 1992; Vivier and Malissen, 2005).

	Inmunidad innata	Inmunidad adaptativa
Tiempo de respuesta	Temprana (horas)	Tardía (días)
Especificidad	Moléculas compartidas por patógenos (PAMPs) o producidas por células dañadas del hospedador (DAMPs)	Amplia variedad de antígenos microbianos y no microbianos (proteínas, péptidos)
Diversidad	Limitada; codificada por la línea germinal	Muy amplia; los receptores se producen por recombinación somática de segmentos génicos
Componentes	Barreras (piel, mucosas); complemento; fagocitos y NKs	Linfocitos B y T; anticuerpos
Receptores	Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)	Receptores específicos de antígeno (BCR, TCR)

Tabla I1. Principales características de la inmunidad innata y adaptativa.

1.2- Inmunidad innata.

La inmunidad innata es la primera línea de defensa y la más rápida contra las infecciones que tiene lugar principalmente en zonas expuestas a patógenos como son la piel o mucosas. Tradicionalmente ha sido considerada una respuesta inespecífica y limitada a contener la infección mediante mecanismos primitivos, dando tiempo al hospedador para poner en marcha la respuesta inmunitaria adaptativa (Iwasaki and Medzhitov, 2010). Sin embargo, debido a su capacidad de distinguir una gran variedad de patógenos a través de unos pocos receptores

altamente conservados (Akira et al., 2006), los últimos veinte años han supuesto una revolución en la comprensión de la regulación cruzada de la inmunidad innata y adaptativa (Beutler, 2009; Janeway, 1989; Medzhitov and Janeway, 2002).

1.2. a) Componentes celulares del sistema inmunitario innato.

Entre las células implicadas en este tipo de inmunidad, se encuentran células fagocíticas (neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas) (Dale et al., 2008; Geissmann et al., 2010), células asesinas naturales o NK (del inglés *Natural killer*) (Vivier et al., 2008) y otras células no hematopoyéticas como las células epiteliales y endoteliales. Entre los componentes humorales se encuentran proteínas circulantes efectoras, como las del sistema del complemento (Clarke and Tenner, 2014; Elward and Gasque, 2003).

Las primeras células encargadas del reconocimiento de patógenos en el torrente sanguíneo son los neutrófilos y los monocitos circulantes, mientras que en los tejidos o en los principales sitios de entrada de patógenos, este reconocimiento ocurre principalmente a través de las células presentadoras de antígeno (APCs, del inglés *Antigen Presenting Cells*), entre las que se incluyen los macrófagos (Mφs) y las células dendríticas (DCs, del inglés *Dendritic Cells*).

1.2. b) Células dendríticas (DCs).

Las DCs fueron inicialmente descritas por sus características morfológicas y su extraordinaria capacidad para presentar antígenos e iniciar respuestas de células T (Steinman and Cohn, 1973, 1974) }. Estas células se localizan tanto en órganos linfoides (timo, bazo y ganglios linfáticos), como en todos los demás tejidos y órganos no linfoides. Forman una red compleja y sofisticada que les permite comunicarse con las diferentes poblaciones de linfocitos, formando así una interconexión entre el ambiente externo y el sistema inmune adaptativo. Para proporcionar esta protección, existen diferentes poblaciones de DCs (Figura I1). Estas DCs se han especializado para residir en diferentes localizaciones, donde captan antígenos y los transportan a los ganglios linfáticos para su procesamiento y presentación en la superficie celular a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major histocompatibility complex*) a los distintos linfocitos T vírgenes. Las DCs tienen la capacidad de dirigir la

diferenciación de las células T colaboradoras (Th, del inglés *T helper*) a distintos tipos de células efectoras: Th1, Th2 o Th17, o células T citotóxicas (Tc, del inglés *T cytotoxic*) en función del patógeno detectado, así como a células T supresoras o reguladoras (Treg) implicadas en tolerancia. Esta gran plasticidad viene determinada por el patrón de expresión de sus numerosos receptores de reconocimiento, que a su vez depende del subtipo de DC, de la localización, linaje y función especializada (Belz and Nutt, 2012; Huang et al., 2001; Romani et al., 2002; Steinman, 2007, 2011).

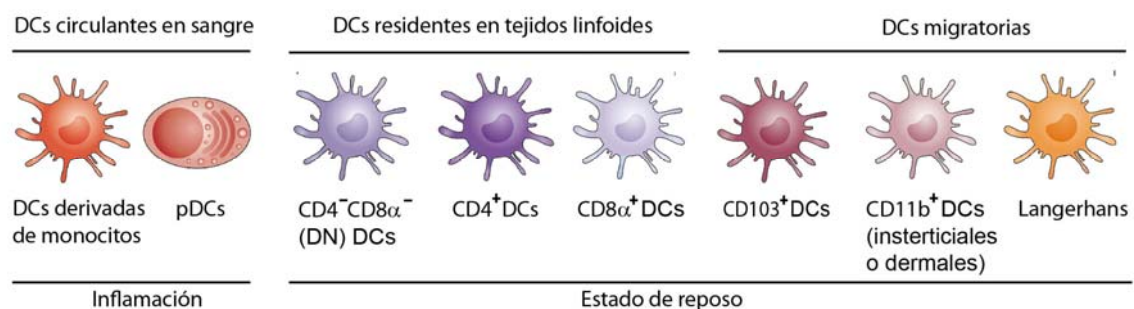


Figura I1. Distribución de poblaciones de células dendríticas.

La figura muestra la organización de la red de DCs en función de su localización y marcadores fenotípicos clave de superficie. Tanto las DCs derivadas de monocitos como las DCs plasmacitoides (pDCs) son reclutadas rápidamente a sitios de inflamación, mientras que otras poblaciones de Dcs están presentes en el organismo en estado de reposo (adaptado de (Belz and Nutt, 2012)).

Según su localización y función pueden dividirse en: DCs convencionales, las cuales predominan en estado de reposo y se dividen en migratorias o residentes en tejido; Langerhans, que son residentes en la piel; Dcs plasmacitoides (pDCs); y DCs derivadas de monocitos (moDCs) generadas en respuesta a inflamación o infección (Belz and Nutt, 2012).

Las Dcs generadas *in vitro* en respuesta a factores de crecimiento como el factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF, del inglés *Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor*) simulan a DCs inflamatorias, y de forma similar a las convencionales, presentan como marcadores fenotípicos de superficie una alta expresión CD11c y expresión de MHCII.

1.2. c) Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y receptores de reconocimiento (PRRs).

La mayoría de los componentes moleculares asociados a estos patógenos como componentes de pared, tales como carbohidratos, proteínas o ácidos nucleicos son motivos microbianos altamente conservados puesto que son esenciales para la supervivencia del patógeno y se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *Pathogen-associated molecular patterns*)(Janeway, 1989). Estos PAMPs no se encuentran en los mamíferos y por tanto representan una diana ideal para el reconocimiento de lo “no propio” por las células del sistema inmune (Janeway, 1992).

Las células del sistema inmune innato poseen una amplia colección de receptores codificados en la línea germinal que son esenciales para montar una respuesta inmune efectiva. Estos receptores expresados en el hospedador, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *Pattern recognition receptors*), detectan de forma específica una amplia variedad de PAMPs y activan determinadas vías de señalización dando lugar a respuestas muy concretas frente a los distintos patógenos reconocidos (Akira et al., 2006). El reconocimiento del patógeno puede ocurrir de forma directa a través de PRRs de membrana o citoplasmáticos, o de forma indirecta mediante PRRs solubles.

En los mamíferos, los PRRs mejor caracterizados son los TLRs (del inglés, *Toll-like receptors*) (Takeda and Akira, 2003), localizados en la membrana plasmática o a nivel endosomal y capaces de detectar componentes de la pared celular bacteriana, proteínas virales a nivel de superficie o ácidos nucleicos microbianos presentes en vesículas como los endosomas o fagosomas (Ishii and Akira, 2008). A lo largo de los últimos años, se ha demostrado que otros PRRs de tipo no-TLR como la superfamilia de los receptores de lectina de tipo C (CLRs, del inglés *C-type lectin-like receptors*) (Geijtenbeek et al., 2004; Ishii and Akira, 2008), también desempeñan un papel determinante en inmunidad antifúngica. Existen otros PRRs citoplasmáticos como los receptores tipo NOD (NLRs, del inglés *NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain) -like receptors*) (Fritz et al., 2006) o los receptores de tipo RIG-1 (RLRs, del inglés *Retinoic-acid-Inducible Gene-1-like receptors*) (Yoneyama and Fujita, 2007) que actúan como sensores intracelulares frente a peptidoglucanos bacterianos y ácidos nucleicos virales, respectivamente.

1.2. d) Receptores de lectina tipo C (CLRs).

Dentro de la superfamilia de las lectinas se encuentra la familia de las lectinas tipo C, que se caracteriza porque sus miembros presentan al menos un dominio lectina de tipo C o CTLD (del inglés *C-Type Lectin-like Domain*) en su extremo extracelular. Este dominio estructural, altamente conservado, está constituido por dos bucles proteicos estabilizados por puentes disulfuro en la base de cada uno de ellos. (Zelensky and Gready, 2005). El segundo bucle es más flexible que el primero y es el que generalmente contiene el sitio de unión al ligando (Drickamer, 1999). Existe una amplia variedad de proteínas que contienen CTLDs implicadas en la adhesión célula-célula, en la respuesta inmune frente a patógenos e incluso en la detección de necrosis (Cambi and Figdor, 2009; Drickamer, 1999; Sancho et al., 2009). La variedad estructural también es muy amplia, dependiendo de la presencia de uno o múltiples dominios CTLD (McGreal et al., 2004).

Estos receptores fueron originalmente definidos como una familia soluble y transmembrana con un dominio de reconocimiento de carbohidratos o CRD (del inglés *Carbohydrate Recognition Domain*) donde unían carbohidratos (lectinas) de forma dependiente de Ca^{2+} (*C-type*) (Drickamer, 1988, 1989). A medida que fueron descubriéndose más proteínas que poseían este dominio, se vio que no estaba únicamente restringido a la unión de carbohidratos o a Ca^{2+} , sino que muchas reconocen específicamente proteínas, lípidos e incluso ligandos inorgánicos. Por este motivo se introdujo el término CTLD o "*C-type lectin-like domain*" (Drickamer, 1993; Drickamer, 1999; Weis et al., 1998). Actualmente esta superfamilia está constituida por más de 1000 proteínas que se clasifican en diecisiete subgrupos (I-XVII), basándose en la organización de su dominio y filogenia (Zelensky and Gready, 2005).

Entre los CLRs podemos encontrar lectinas solubles, como la lectina de unión a manosa (MBL, del inglés *Mannose Binding Lectin*) (Kawasaki et al., 1983), o lectinas de membrana, subdivididas a su vez en dos grupos en función de la localización del extremo N-terminal: tipo I y tipo II. Los de tipo I, como el receptor de manosa (MR, del inglés *Mannose Receptor*), poseen el extremo N-terminal en el exterior celular y hasta diez dominios CTLD. Los de tipo II tienen el extremo N-terminal en el interior y pertenecen a la denominada familia del receptor de la asialoglicoproteína, que a su vez posee dos subfamilias, la de DCIR (del inglés *DC*

immunoreceptor) y la de Dectin-1 (del inglés *DC-associated C-type lectin1*) (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). Dichas lectinas son las que se expresan mayoritariamente en DCs y se caracterizan por presentar un dominio intracelular corto y una región conectora de tamaño variable que une el CTLD a la región transmembrana y que en la mayoría de los casos está implicada en la multimerización del receptor. Muchos de estos CLRs están implicados en inmunidad antifúngica, como el MR, Dectin-2, DC-SIGN (del inglés *Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin*), Mincle (del inglés *macrophage-inducible C-type lectin*) o Dectin-1. Todos ellos median la unión, captación y eliminación del patógeno y contribuyen al inicio y/o modulación de la respuesta inmune.

1.2. d. i) Clasificación de los CLR según su motivo de señalización intracelular.

Los CLRs pueden señalizar directamente a través de los motivos integrales en su cola citoplasmática, o indirectamente, a través de asociación con cadenas adaptadoras.

La mayoría de los CLRs de activación se asocian con cadenas adaptadoras que contienen motivos ITAM (del inglés *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), como la cadena FcR γ (del inglés *Fc receptor γ chain*) como es el caso de Dectin-2 y Mincle. Otro ejemplo de proteína adaptadora sería DAP12 (del inglés *DNAX activation protein of 12kDa*) que puede asociarse con MDL-1 (del inglés *myeloid DAP12-associating lectin-1*). La secuencia consenso del motivo ITAM es [YxxI/LX₍₆₋₁₂₎YxxI/L] (donde x designa algún aminoácido e Y la tirosina). Su activación ocurre cuando la unión del ligando causa la agrupación del receptor y fosforilación de los dos residuos tirosina dentro de esta secuencia ITAM por un miembro de la familia de las Src quinasas. Muchos receptores mieloides asociados a ITAM unen a la tirosina quinasa de bazo, Syk (del inglés *Spleen tyrosine kinase*), cuyos dominios SH2 interactúan con las dos fosfotirosinas del ITAM para activar Syk completamente (Tsang et al., 2008).

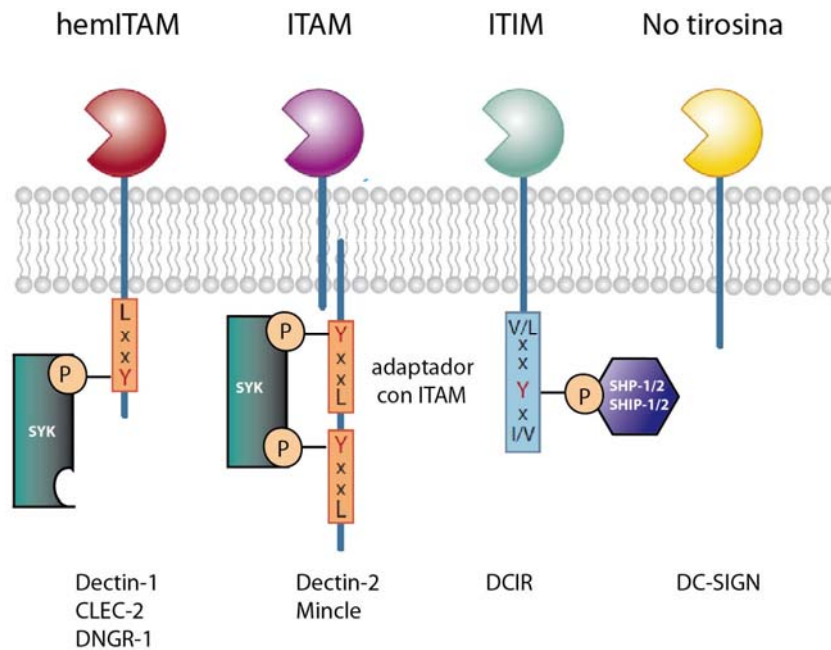


Figura I2. Clasificación de CLR mieloides por sus motivos de señalización.

Los CLR mieloides suelen ser proteínas transmembrana de tipo II que pueden activar Syk directamente a través de hemITAM o indirectamente a través de proteínas adaptadoras que contienen motivos ITAM (por ejemplo, la cadena $\text{Fc}\gamma$ o DAP12) tras la fosforilación de las tirosinas (Y) presentes en estos motivos de señalización. Los CLR que contienen motivos ITIM, en cambio pueden inhibir células mieloides por activación de fosfatasa como SHP o SHIP tras la fosforilación de tirosina. Existen otros CLR que no señalizan a través de ninguno de los motivos anteriores como DC-SIGN (adaptado de (Sancho and Reis e Sousa, 2012)).

A pesar de que el motivo hemITAM sólo posee una secuencia tándem YXXL, se ha demostrado su asociación a Syk y su capacidad para activarlo (Rogers Immunity 2005). Entre los receptores que contienen hemITAM se encuentran Dectin-1, CLEC-2, DNGR-1 (del inglés *DC, NK-lectin group receptor 1*) y SIGN-R3 (Huysamen et al., 2008; Rogers et al., 2005; Sancho et al., 2009; Suzuki-Inoue et al., 2006; Tanne et al., 2009). Syk es capaz de unirse a homodímeros de CLEC-2 que contienen una única fosfotirosina (Kerrigan and Brown, 2010).

Las rutas de activación por debajo de Syk incluyen la activación de las MAPK (del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinases*) permitiendo la transcripción de múltiples genes, reorganización de citoesqueleto de actina a través de activación de las enzimas Rac y Rho GTPasas y la activación de NF- κ B (del inglés, *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) a través de múltiples rutas. La señalización por debajo de los motivos ITAM o hemITAM también puede activar

NFAT (del inglés *Nuclear factor of activated T-cells*) producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), producción de IL-1 β y activación del inflamasoma NLRP3 (Poeck and Ruland, 2010; Wen et al., 2012). La respuesta efectora de los ITAM es muy versátil y esta vía puede iniciar procesos como fagocitosis, proliferación celular, migración, diferenciación y adhesión. Sin embargo, el control de estos mecanismos es también un proceso vital, por lo que receptores que contienen motivos ITIM están a menudo implicados en la regulación negativa de estas respuestas activadas a través de ITAMs.

La secuencia ITIM (del inglés, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) está descrita como [I/V/L/ SxYxxI/L/V], donde la tirosina central está fosforilada por las quinasas de la familia Src. Sin embargo, en lugar de reclutar Syk, los receptores que contienen motivos ITIM reclutan tirosina fosfatasas para regular negativamente la actividad de vías de señalización positivas (Kerrigan and Brown, 2010). En muchos casos, CLRs que contienen ITIMs se asocian con la fosfatasa SHP-1 y SHP-2, las cuales son capaces directamente de afectar señalización de las vías ITAM y JAK/STAT. SHP-1 y SHP-2 también son capaces de regular la señalización de TLRs reduciendo la actividad NF- κ B (Sancho and Reis e Sousa, 2012). También puede ocurrir asociación entre un motivo ITIM y las fosfatasas SHIP-1 o SHIP-2, inhibiendo señales que son iniciadas por la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K, del inglés *Phosphoinositide 3-kinase*) (Sattler et al., 2001) (Svajger et al., 2010).

Por último, existen CLRs que señalizan a través de motivos que no se adaptan a ninguno de los anteriores puesto que no poseen tirosina (por ejemplo, DC-SIGN) (Sancho and Reis e Sousa, 2012).

1.3- Dectin-1 (CLEC7A).

Dectin-1 es un CLR que fue descubierto por unir β -1,3-glucanos de origen fúngico. Además puede reconocer también un ligando no identificado en micobacterias, así como un ligando endógeno presente en células T (Ariizumi et al., 2000; Brown and Gordon, 2001; Yadav and Schorey, 2006). Desde entonces, ha sido uno de los CLRs más estudiados con muchas de sus características bien definidas y ha llegado a ser un receptor modelo para señalización de CLRs.

1.3.a) Descripción, estructura y expresión de Dectin-1.

Dectin-1 (del inglés “*Dendritic-cell-associated C-type lectin 1*”) no se expresa exclusivamente en DCs de ratón y se puede encontrar en otros tipos celulares incluyendo macrófagos, neutrófilos y monocitos y en poblaciones de células T $\gamma\delta$. (Martin et al., 2009; Taylor et al., 2002). Dectin-1 humano muestra un patrón de expresión similar, pero además es expresado en células B, eosinófilos y mastocitos (Olynich et al., 2006; Willment et al., 2005).

Al igual que otros receptores transmembrana de tipo II, Dectin-1 consta de un extremo C-terminal extracelular que contiene un único dominio CTLD, el cual está involucrado en interacciones del ligando independientes de calcio. Este dominio está conectado a una región transmembrana denominada conector y unido al extremo citoplasmático presenta una pequeña cola intracelular de 40 aminoácidos, donde se localiza el motivo hemITAM [YxxL] y un residuo de tres aminoácidos [DED] (Ariizumi et al., 2000; Brown and Gordon, 2001; Hermanz-Falcon et al., 2001). Dectin-1 de ratón comparte con el de humano un 60% de su identidad y hasta un 71% de homología y está localizado en el agrupamiento génico clásicamente denominado Complejo *Natural killer* o *NK-Complex* (NKC), en el brazo corto del cromosoma 12 (Hermanz-Falcon et al., 2001). Ambos tienen múltiples variantes, aunque cada uno tiene dos isoformas principales que difieren en la ganancia o pérdida de la región conectora, isoformas A y B respectivamente (Willment et al., 2001).

1.3.b) Ligandos, señalización y respuestas controladas por Dectin-1.

A través del reconocimiento de β -1,3-glucanos, Dectin-1 reconoce diversas especies fúngicas como *Aspergillus*, *Candida*, *Coccidioides*, *Penicillium*, *Pneumocystis* y *Saccharomyces* (comúnmente usado como extracto conocido como zymosan). Debido a esto, el estudio de su papel inmunológico ha sido dirigido a inmunidad contra hongos.

Tras el reconocimiento de β -glucanos, Dectin-1 puede inducir una amplia gama de efectos celulares incluyendo fagocitosis mediada por actina, producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) maduración de DCs e inducción de patrones de expresión de citoquinas y quimioquinas como TNF, IL-1 α , IL-1 β IL23-

p19, IL-10, IL-12 p35, IL-12 p70, IL-12/23 p40 IL-6, CXCL2, CCL3 y GM-CSF (Brown, 2006; Gringhuis et al., 2009; Gringhuis et al., 2011; Huysamen and Brown, 2009; Leibundgut-Landmann et al., 2007).

La señalización de Dectin-1 en células mieloides tras el reconocimiento de ligando ocurre tras la formación de homodímeros, como se ha descrito para CLEC-2 (Hughes et al., 2010), e involucra cascadas de señalización dependientes e independientes de Syk, junto con vías de receptores colaboradores tales como TLRs (figura I3).

Dentro de las vías que conducen a la activación de NF- κ B dependiente de Syk pueden ser clasificadas en canónicas y no canónicas. Syk desencadena el reclutamiento de CARD9 (del inglés *Caspase recruitment domain-containing protein 9*) a la membrana (Hernanz-Falcón et al., 2009; Rosas et al., 2008) o a fagosomas que contienen partículas fúngicas fagocitadas (Goodridge et al., 2009). El complejo CARD9/Bcl10/Malt-1 modula entonces la activación del complejo I κ B quinasa (IKK) para la señalización canónica de NF- κ B: IKK α fosforila a I κ B y promueve su degradación, permitiendo la translocación al núcleo a los miembros de la familia NF- κ B (Gross et al., 2006). Dectin-1 puede también activar la vía no canónica de NF- κ B (RelB) de manera dependiente de la quinasa NIK (del inglés *NF- κ B-inducing kinase*) e independiente de CARD9 (Gringhuis et al., 2009). La activación de NF- κ B es la base del programa inflamatorio de activación de células mieloides que conduce a la maduración de DCs y secreción de citoquinas (Leibundgut-Landmann et al., 2007; Leibundgut-Landmann et al., 2008). Dectin-1 humano también puede inducir una segunda vía de señalización mediada por la serina-treonina quinasa Raf-1 de forma independiente a Syk, aunque converge con la vía canónica acoplada a Syk a nivel de NF- κ B (Gringhuis et al., 2009).

La señalización de Dectin-1 también resulta en la activación de MAPKs como p38 (del inglés *P38 mitogen-activated protein kinases*), ERK (del inglés *extracellular-signal-regulated kinases*), y JNK (del inglés *c-Jun N-terminal kinases*) (Leibundgut-Landmann et al., 2007; Slack et al., 2007) y NFAT (Goodridge et al., 2007) que cooperan con NF- κ B en la regulación génica (Sancho and Reis e Sousa, 2012).

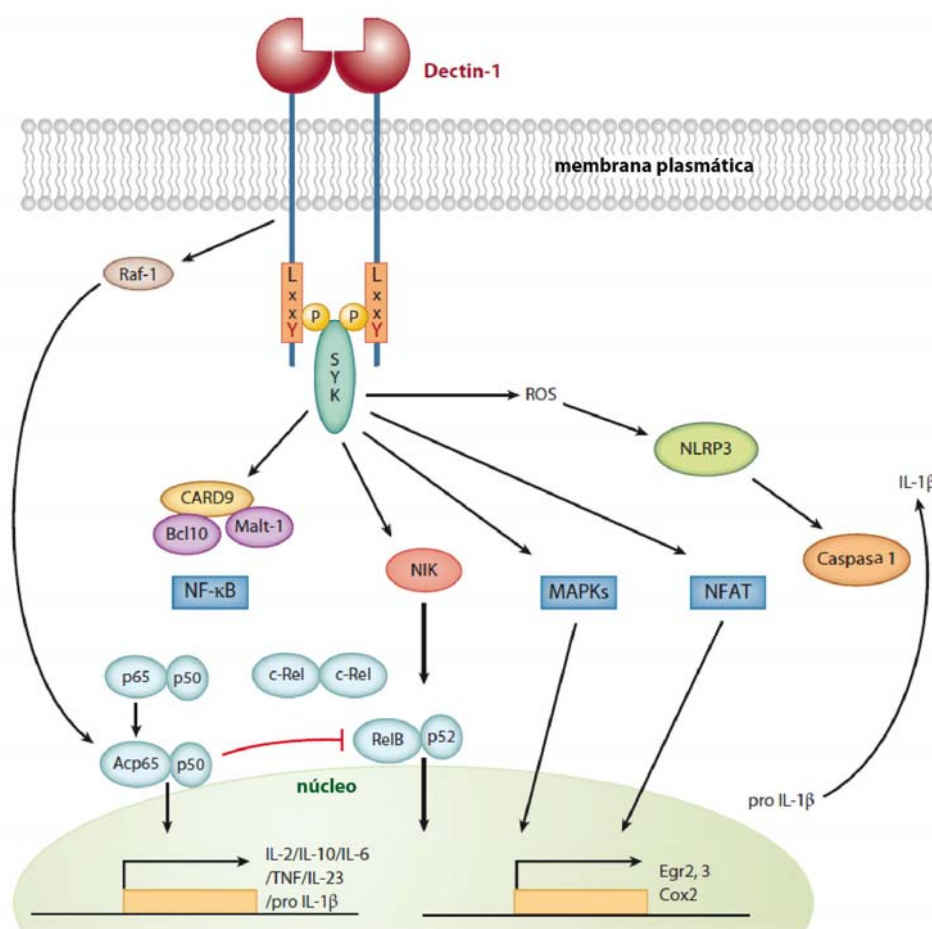


Figura I3. Dectin-1 como modelo de CLR acoplado a hemiTAM.

Tras unir ligandos agonistas, Dectin-1 recluta a Syk a través de la fosfotirosina presente en su motivo hemiTAM. Syk induce producción de ROS que actúa como agente microbicida y contribuye a la activación del inflammasoma NLRP3, permitiendo el procesamiento de pro-IL-1 β . Syk también permite la activación de NF- κ B a diferentes niveles: por una parte permite la activación de CARD9/Bcl10 para activar la vía canónica p65/p50 y Malt-1 que activa c-Rel en DCs humanas, por otra parte activa NIK y la vía no canónica de RelB, independiente de CARD9. La vía canónica puede ser también activada por Raf de forma independiente de Syk. Por último, Syk activa las cascadas de MAPKs y NFAT que resultan en la regulación génica en cooperación con NF- κ B (adaptado de (Sancho and Reis e Sousa, 2012)).

Además de inducir respuestas transcripcionales, la activación de Syk en células mieloides puede influir en migración, fagocitosis o actividad microbicida (Mócsai et al., 2010). Por ejemplo, se ha descrito que la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en fagosomas de macrófagos es dependiente de Syk (Gross et al., 2006; Underhill et al., 2005). Estos ROS tienen un papel microbicida directo en el fagosoma, pero también pueden afectar la secreción de IL-1 β al

activar al inflamasoma NLRP3, el cual activa la caspasa-1 y permite el procesamiento de pro-IL1 β . La IL-1 β es esencial para inmunidad antifúngica y de hecho, ratones deficientes en NLRP3 son altamente susceptibles a infección fúngica. (Gross et al., 2009).

Por otra parte, también ha sido descrito que componentes de la NADPH oxidasa como Gp91phox y p40phox están implicados en la producción de estos ROS mediados por Dectin-1 (Ma et al., 2012; Tam et al., 2014b). Un ejemplo de esto lo que ocurre en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, donde la elevada producción de ROS va acompañada de una mayor fosforilación de Syk y p40phox (Ma et al., 2014). Sin embargo, se desconoce el mecanismo preciso que permite la activación de NADPH oxidasa y la producción de ROS de Dectin-1 y Syk.

La naturaleza del ligando también tiene un papel en el alcance de la señalización de Dectin-1: ligandos particulados grandes que inducen una “fagocitosis frustrada” (Rosas et al., 2008) resultan en un aumento de las respuestas inflamatorias, sugiriendo que la endocitosis atenúa la señalización de Dectin-1 (Hernanz-Falcón et al., 2009; Rosas et al., 2008).

1.3. c) Función de Dectin-1 en el control de la infección fúngica.

Varios grupos han demostrado el papel esencial de Dectin-1 en modelos de ratón, donde la pérdida de Dectin-1 resulta en un fallo para montar respuestas inflamatorias y en la consiguiente incapacidad para controlar el crecimiento fúngico desarrollando susceptibilidad a la infección con *C. albicans* tanto a nivel sistémico como en mucosas (Carvalho et al., 2012; Gales et al., 2010; Hise et al., 2009; Taylor et al., 2007; Werner et al., 2009). Otro grupo encontró que Dectin-1 no tiene un papel en inmunidad a infecciones sistémicas con este patógeno, diferencia que se puede explicar porque estos investigadores emplearon una cepa diferente de *C. albicans* y porque el ratón deficiente para Dectin-1 se generó en un fondo genético distinto (Saijo et al., 2007). El fondo genético de los ratones puede influenciar la respuesta a *C. albicans* (Ashman et al., 1996; Hector et al., 1982), puesto que podrían incluso expresar diferentes isoformas de Dectin-1 que afectan la generación de respuesta inmune (Carvalho et al., 2012; Heinsbroek et al., 2006). Sin embargo, posteriormente se ha descrito que la contribución de Dectin-1 en el control de infecciones sistémicas de *C. albicans* se limita a una cepa específica.

Estas cepas pueden adaptarse diferencialmente durante la infección, mostrando variaciones tanto en la composición como la naturaleza de la pared celular que determinan el papel de Dectin-1. En este estudio describieron que el reconocimiento de la cepa SC5314 de *C. albicans* es dependiente de Dectin-1 independientemente del fondo genético de los ratones, debido a que la pérdida de Dectin-1 fue asociada con una mayor carga fúngica en el riñón y una respuesta alterada de citoquinas (Marakalala et al., 2013).

El control inicial de la infección fúngica tiene lugar a través de la fagocitosis y la producción de ROS por los neutrófilos, que da lugar a la destrucción del patógeno (Miramon et al., 2012). Dectin-1 es un importante receptor fagocítico antifúngico (Brown, 2006; Saijo et al., 2007; Taylor et al., 2007), si bien está ampliamente aceptada la colaboración con otros receptores que es importante para un control efectivo de la infección (Netea et al., 2006b). De hecho, Dectin-1 puede colaborar con muchos TLRs acoplados a MyD88 (del inglés *Myeloid differentiation primary response gene* (88)) incluyendo TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 y TLR9 (Dennehy et al., 2008; Kerrigan and Brown, 2010). Se ha mostrado que la colaboración entre Dectin-1 y TLR2 es importante para la fagocitosis así como para la actividad MAPK en el control de infecciones por *C. albicans*, donde la señal cooperativa es necesaria para desencadenar una producción de citoquinas efectiva y conducir a la respuesta Th17 (Goodridge and Underhill, 2008). Además, se ha descrito que Dectin-1 colabora con SIGNR1 induciendo TNF (Taylor et al., 2004) o con la tetrasparina CD63, durante la fagocitosis de *Saccharomyces cerevisiae* en DCs (Mantegazza et al., 2004). Dectin-1 es también capaz de activar el receptor 3 del complemento (CR3 o Mac-1) para potenciar el reconocimiento fúngico y la respuesta de neutrófilos (Li et al., 2011b) o de cooperar con Dectin-2 en la producción de respuestas Th1 y Th17 durante la infección sistémica de *C. albicans*. (Robinson et al., 2009).

1.4- *Candida albicans*

C. albicans es el hongo patógeno más prevalente en humanos causante de infecciones locales de la piel, uñas, cavidad oral y tracto genitourinario (Lionakis and Netea, 2013). A pesar de su potencial patogenicidad, *C. albicans* generalmente se comporta como un comensal inocuo en individuos sanos. Sin embargo, en

individuos inmunocomprometidos, *C. albicans* puede extenderse sistémicamente a través del torrente sanguíneo y hospedarse en el riñón, el cual actúa de principal sitio de replicación fúngica (Lehner, 1964; Lionakis et al., 2011). A pesar del potencial de varias drogas antifúngicas, la candidiasis invasiva todavía tiene una alta tasa de mortalidad de entre el 45-75% (Brown et al., 2012).

1.4.a) Morfología de *C. albicans*: relación entre dimorfismo y virulencia

C. albicans es un hongo polimórfico que puede crecer tanto en forma levaduriforme (blastoesporas) como o en forma de hifas y pseudohifas dependiendo del ambiente (temperatura, presencia de suero, pH, etc) (Sudbery, 2011). Esta habilidad de *C. albicans* para cambiar rápidamente de morfología y de forma reversible es crucial en su patogenicidad y juega un papel fundamental en la colonización, adhesión y virulencia (Brown and Gow, 1999; Gow et al., 2011a; Romani et al., 2002). Además, las formas levaduriformes parecen adaptarse mejor a crecimientos rápidos, facilitando su diseminación por el torrente sanguíneo durante el inicio de la infección. Las hifas por el contrario, son más resistentes a la fagocitosis debido a su morfología y tamaño, pueden provocar la muerte del fagocito si germinan en su interior y son capaces de penetrar a través de las capas epiteliales y endoteliales facilitando la invasión. Consecuentemente, la forma filamentosa se ha visto implicada en provocar un mayor daño tisular (Saville et al., 2003), mientras que los mutantes incapaces de formar hifas son menos virulentos en algunos modelos experimentales (Lo et al., 1997).

1.4.b) Estructura de la pared celular.

La pared celular de *C. albicans* contiene carbohidratos y proteínas de pared que no están presentes en mamíferos y que representan una diana inmunológica ideal para discriminar lo propio de lo no propio. Como consecuencia, estos componentes de la pared celular constituyen la mayoría de los PAMPs fúngicos que activan y modulan las respuestas inmunes (Romani, 2011).

Como se puede ver en la figura I4, la pared celular de *C. albicans* está constituida por un 80-90% de carbohidratos, con una capa externa que está compuesta por mananos covalentemente asociados con proteínas formando glucoproteínas y una capa interna que contiene un esqueleto de polisacáridos,

quitina y β -1,3 glucanos, los cuales confieren forma y resistencia a la pared. Las proteínas de la pared celular de la capa externa están ancladas a la capa interna mediante remanentes de glicosilfosfatidilinositol que se unen al esqueleto de polisacáridos a través de un β -1,6 glucano más flexible (Gow et al., 2011a).

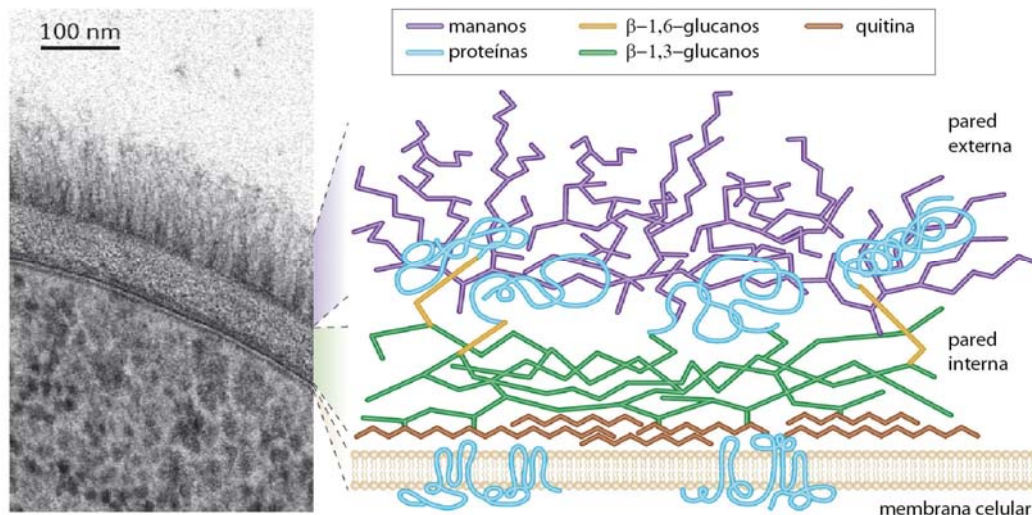


Figura I4. Estructura de la pared celular de *C. albicans*.

En la figura se muestra una micrografía electrónica de la pared celular de *C. albicans* junto su estructura y componentes. (adaptado de (Gow et al., 2011b)).

Aunque los componentes básicos de la pared celular de *C. albicans* son similares en la levadura y en las formas filamentosas (hifa o pseudohifa), el proteoma de la superficie y la cantidad de PAMPs individuales presentados difiere substancialmente, por lo que la morfología del hongo va a ser un factor determinante para su detección por el sistema inmune. Un ejemplo de esto es lo que ocurre con los β -glucanos de la pared celular de la levadura que están en gran medida protegidos de Dectin-1 por los componentes de la pared externa. Sin embargo, los mecanismos de gemación de la levadura y de separación celular constantemente generan cicatrices en las cuales se expone suficiente β -glucano para desencadenar respuestas antimicrobianas a través de Dectin-1. Durante el crecimiento filamentosos no ocurre esta separación celular, por lo que los β -glucano no van a ser expuestos y por consiguiente va a afectar a su reconocimiento por parte de Dectin-1 (Gantner et al., 2005).

Esta exposición de β -glucanos de *C.albicans* puede ser potenciada en el proceso de muerte por calor (*HK*, del inglés *Heat killed*). Se ha demostrado que los efectos desencadenados con este estímulo son mayoritariamente dependientes de Dectin-1 (Gow et al., 2007; Netea et al., 2006a).

1.5- SHIP-1

La vía de la de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) tiene un papel importante en la regulación de muchos procesos biológicos a través de la generación de un potente segundo mensajero PI-3,4,5-P₃ (PIP₃) (Krystal, 2000). Este fosfolípido asociado a membrana está presente a bajos niveles en células en reposo y se sintetiza rápidamente por PI3K en respuesta a una diversa variedad de estímulos extracelulares. Una vez asociado a membrana, PIP₃ contribuye al reclutamiento de proteínas como Akt, Rac y Cdc42 o Vav a la membrana, donde median sus efectos. Para modular la activación de esta vía actúan por un lado el supresor de tumores de 54 kDa PTEN que se expresa ubicuamente e hidroliza PIP₃ a PI-4,5-P₂; por otro lado, la inositol fosfatasa SHIP-1 de 145 kDa (restringida a células hematopoyéticas) o SHIP-2 de 155 kDa (más ampliamente expresada en otros tipos celulares) hidrolizan PIP₃ a PI-3,4-P₂. (Sly et al., 2003).

1.5.a) Descripción, estructura y expresión de SHIP-1

La inositol 5'fosfatasa (SHIP-1 o SHIP-1 α) se expresa de manera predominante en células del compartimento hematopoyético (eritrocitos, células T y B, granulocitos, monocitos/macrófagos, mastocitos, plaquetas y células NK) (Kerr, 2011), pero también por osteoblastos (Hazen et al., 2009), y está codificada por el gen *INPP5D*, el cual está localizado en el cromosoma 2q36/37 en humanos y en el 1C5 en ratón. Es un importante regulador de muchos procesos biológicos, incluyendo proliferación, diferenciación, supervivencia, activación y migración a través de su capacidad para disminuir la vía PI3K en las células hematopoyéticas.

Esta proteína de 145 kDa contiene distintos dominios que le permiten interaccionar con una variedad de proteínas (figura I5). Contiene un dominio SH2 amino terminal a través del cual une proteínas fosforiladas en tirosina como por ejemplo Shc, SHP-2, Doks, (Yogo et al., 2006), y ciertos ITIMs e ITAMs (Sly et al.,

2003). Además, posee un dominio fosfatasa localizado centralmente que específicamente hidroliza el fosfato 5' de PIP_3 , PI-4,5-P_2 (Pesesse et al., 2006). También posee un dominio C2, justo al lado C-terminal del dominio fosfatasa, que es un sitio de activación alostérica cuando une el producto enzimático de SHIP-1, PI-3,4-P_2 (Ong et al., 2007). Por último, en el extremo C-terminal contiene una región rica en prolina que permite la unión de proteínas con un dominio de unión a fosfotirosina (por ejemplo, Shc, Dok 1, Dok 2) o proteínas que contienen SH3 incluyendo Grb2, Src, Lyn, Hck, (Rohrschneider et al., 2000; Sly et al., 2003; Song et al., 2005; Wisniewski et al., 1999).

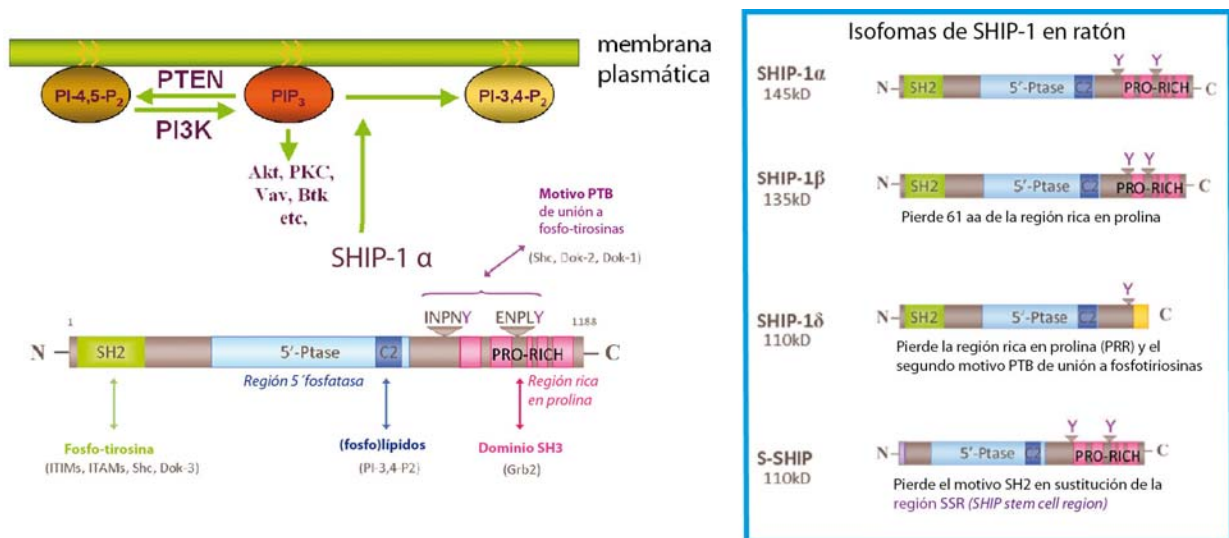


Figura I5. Función y estructura de SHIP.

La función de SHIP-1 es la degradación de PIP_3 a PI-3,4-P_2 que también puede funcionar como segundo mensajero. Posee un dominio SH2 N terminal y una región rica en prolina en la región C-terminal que le permiten interaccionar con diversas proteínas. En la región central posee el dominio 5'-fosfatasa que hidroliza PIP_3 . En ratón, además de SHIP-1α (145 kDa) existen otras isoformas como SHIP-1β (135 kDa) o SHIP-1δ (110 kDa) que son formas truncadas en la región C-terminal o sSHIP restringido a células madre embrionarias (adaptado de (Sly et al., 2007) y (Conde et al., 2011)).

Además de la isoforma SHIP-1α de 145-kDa se han descrito otras isoformas, incluyendo una isoforma de 160-kDa que podría ser SHIP poliubiquitinado (Geier et al., 1997; Ono et al., 1996), y SHIPβ de 135-kDa y SHIPδ de 110-kDa que son formas truncadas en C-terminal que podrían ser intermediarios formados de una degradación proteasomal (Ruschmann et al., 2010). Finalmente, se ha identificado una forma de SHIP de 104-kDa que se expresa en células madre embrionarias y se

denomina sSHIP (del inglés *Stem Cell SHIP*) (Tu et al., 2001). Estas isoformas se expresan diferencialmente durante la maduración de células hematopoyéticas (Condé et al., 2011).

1.5.b) Fenotipo de ratones deficientes en SHIP-1.

Los ratones deficientes en SHIP-1 fueron generados en 1998 (Helgason et al., 1998) y son viables y fértiles, pero tienen una esperanza de vida reducida debida al desarrollo progresivo de una hiperplasia mieloide, causada por granulocitos y macrófagos/monocitos que deriva en esplenomegalia, linfadenopatía e invasión de órganos vitales como pulmones, corazón o riñones (Helgason et al., 1998; Liu et al., 1999). Esta hiper-proliferación estaría causada tanto porque las células mieloides como sus precursores son más sensibles a factores de crecimiento como GM-CSF o IL-3 (Helgason et al., 1998), como por su menor sensibilidad a estímulos pro-apoptóticos (Liu et al., 1999). Además, presentan hiper-reabsorción de osteoclastos (Takeshita et al., 2002), números reducidos de células T CD8 (Helgason et al., 1998), afectación del repertorio de células NK (Wang et al., 2002b), mastocitos hipersensibles a la degranulación (Huber et al., 1998), aumento de células mieloides en la médula ósea y periferia (Helgason et al., 1998; Liu et al., 1999) y un aumento en células mieloides supresoras (Ghansah et al., 2004). Curiosamente, este aumento de células mieloides supresoras combinado con un repertorio promiscuo de células NK median una disminución significativa de la enfermedad de injerto contra huésped y el rechazo de médula ósea, respectivamente, después de trasplante alogénico de médula ósea. Posteriormente, el grupo de W. Kerr ha mostrado que esta enfermedad letal podía ser curada por un trasplante de médula ósea alogénico desde un donador SHIP-1 competente, indicando que esta enfermedad pulmonar es el resultado de un proceso confinado al compartimento hematopoyético y bajo el control de SHIP-1 (Ghansah et al., 2004; Paraiso et al., 2007; Wang et al., 2002b). Sin embargo, el conjunto de efectos patológicos de la deficiencia de SHIP-1 en ratones SHIP-1^{-/-}, es perjudicial. Para poder estudiar el papel de SHIP-1 en distintos compartimentos, se han generado los ratones CD4Cre SHIP^{flox/flox}, LysMCre SHIP^{flox/flox} o MxCre SHIP^{flox/flox} (Kerr et al., 2011; Paraiso et al., 2007; Tarasenko et al., 2007).

1.5.c) Función biológicas y mecanismo de acción de SHIP-1.

SHIP-1 media sus efectos inhibitorios por translocación a sitios de síntesis de PIP₃. Se ha demostrado que SHIP se traslada a la membrana plasmática en respuesta a estimulación extracelular (Cox et al., 2001; Phee et al., 2000) y tanto el dominio SH2 como el C-terminal rico en prolina son obligatorios para esta translocación y para los efectos biológicos de SHIP-1 (Aman et al., 2000; Damen et al., 2001; Liu et al., 1997).

Aunque la mayoría de los efectos inducidos por SHIP-1 son comúnmente mediados por su hidrólisis de PIP₃, también media algunos de sus efectos al actuar como un adaptador, por ejemplo en la activación de SHP-2 (Koncz et al., 2001), PLCgamma 1 (Song et al., 2005), y Dok (Forestell et al., 1995). Existen además evidencias de que SHIP-1 puede reducir directamente la activación de Ras en algunas células compitiendo con Grb2 por el Shc (Coggeshall, 1998; Ishihara et al., 1999).

En cuanto a las funciones biológicas (figura I6), se ha descrito que SHIP-1 restringe el desarrollo de células supresoras mieloides (MDSCs, el inglés *Myeloid-derived suppressor cells*) (Ghansah et al., 2004) y células T reguladoras (Treg) (Collazo et al., 2009; Kashiwada et al., 2006).

SHIP-1 también regula la maduración y función de DCs. Los ratones SHIP-1^{-/-} presentan en sus bazo un elevado número de DCs cuyo fenotipo está alterado. Además la médula ósea de estos ratones da lugar a una mayor frecuencia de DCs mieloides pero no pDCs debido a un incremento en la frecuencia de progenitores y a una mayor sensibilidad a citoquinas (Neill et al., 2007). Por otra parte, DCs derivadas de médula ósea con GM-CSF *in vitro* de ratones deficientes en SHIP-1 tienen alterada la maduración y producción de IL-12 tras estimulación de TLRs y esto resulta en una reducción de la proliferación de células T específicas de antígeno y una reducción de la respuesta Th1, sugiriendo que SHIP-1 regula negativamente la generación de DCs mieloides desde precursores de médula ósea, pero positivamente regula su maduración al reducir los niveles de PIP₃ (Antignano et al., 2010a). En el caso de DCs diferenciadas con Flt3L, SHIP-1 regula negativamente su proliferación, diferenciación y supervivencia, pero regula positivamente su maduración y función inducida por TLR independiente de MyD88

(Antignano et al., 2010b). Ambos grupos proponen que el defecto de DCs SHIP-1^{-/-} para activar correctamente células T se debe a un efecto intrínseco la delección de SHIP-1 en estas células. Sin embargo, un tercer grupo propone que esto se debe a un efecto de la deficiencia de SHIP-1 extrínseco a las DCs puesto que no encontraron diferencias en la capacidad de presentación antigénica en DCs purificadas a partir de esplenocitos SHIP-1^{-/-}. Proponen por tanto, que la elevada expansión de células mieloides supresoras en estos ratones sería la responsable de la deficiente activación de células T (Ghansah et al., 2004).

En macrófagos se ha descrito que SHIP-1 bloquea su diferenciación desde progenitores mieloides a un fenotipo de macrófagos M2 al reducir los niveles de PIP₃ (Rauh et al., 2005).

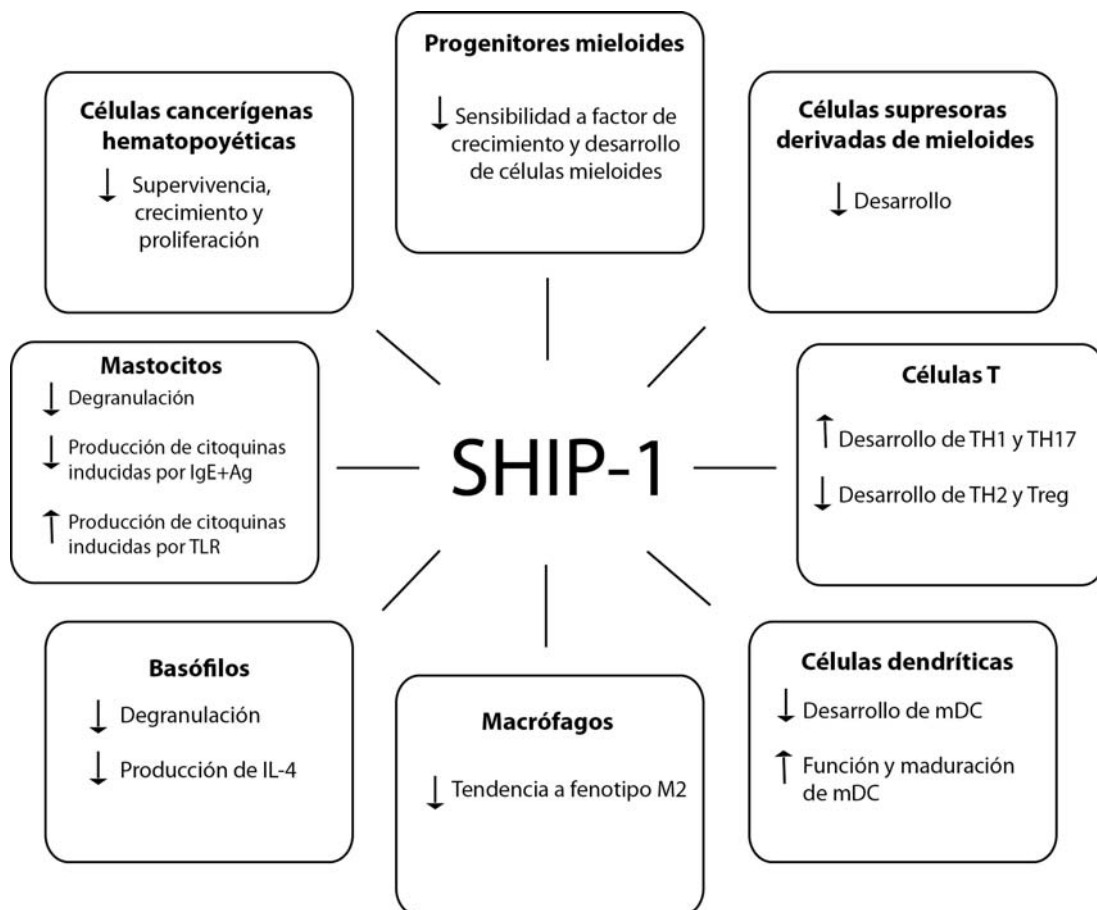


Figura I6. Funciones biológicas de SHIP-1.

En la figura se muestran las principales funciones biológicas que regula SHIP-1 en distintos tipos celulares (adaptado de (Hamilton et al., 2011)).

OBJETIVOS

2.-OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis consistió en encontrar nuevos efectores acoplados al hemITAM de Dectin-1. Al encontrar que la fosfatasa SHIP-1 se asociaba a Dectin-1, se planteó el objetivo de estudiar esta asociación y sus efectos funcionales.

A continuación se exponen los objetivos concretos planteados:

1.- Análisis del proteoma que interacciona con el dominio intracelular de Dectin-1.

2.- Estudio de la interacción de SHIP-1 y Dectin-1.

- Determinación de la interacción mediante inmunoprecipitación.
- Análisis de la colocalización con técnicas de microscopía.

3.- Investigación del papel funcional de SHIP-1 en respuesta a ligandos de Dectin-1 en células dendríticas.

- Caracterización de los ratones deficientes en SHIP-1 en DCs.
- Análisis de la diferenciación y respuestas funcionales de DCs generadas *in vitro*.
- Estudio de la implicación de SHIP-1 en la eficiencia candidicida de las DCs.

4.- Análisis del papel de SHIP-1 en células dendríticas en modelos murinos de infección e inflamación dependientes de Dectin-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Reactivos.

A continuación se describen los reactivos que se han utilizado a lo largo del trabajo en distintas aproximaciones.

3.1. a) *Candida albicans*.

La cepa de *C. albicans* usada ha sido la cepa SC5314, amablemente cedida por la Catedrática Concha Gil de la Universidad Complutense de Madrid. Dicha cepa fue crecida en placas de medio YPD (2% glucosa, 2% peptona, 1% levadura) de Sigma a 30°C y se usaron células procedentes de cultivos en fase estacionaria de crecimiento. Las levaduras muertas por calor (HKC; *heat-killed Candida albicans*) se obtuvieron hirviendo en PBS durante 30 minutos. La tinción de HKC con CFSE o Cell Violet (Molecular Probes) fue realizada a 2.5 µM en PBS y la de *C. albicans* viva a 20 µM, a 37°C durante 10 minutos y posteriormente fue lavada. Las células fueron cuantificadas en una cámara de Neubauer para utilizar la concentración apropiada. Generalmente la estimulación con HKC de las DCs se realizó al ratio 10:1, excepto si se indicase lo contrario. La estimulación con *C. albicans* viva se realizó al ratio 3:1 excepto cuando se indicase lo contrario.

3.1.b) Ratones.

Las colonias de ratones fueron mantenidas en el CNIC en condiciones específicas libres de patógenos. Todos los procedimientos animales se ajustaron a la Directiva Europea 2010/63EU y a la Recomendación 2007/526/EC de acuerdo a la protección de animales de uso experimental y otras propuestas científicas, regulada en la ley española bajo el Real Decreto 1201/2005. Los ratones CD11c^{Cre/+} SHIP-1^{flox/flox} (CD11cΔSHIP-1) se generaron a partir del cruce de ratones CD11c^{Cre/+} cedidos por Boris Reizis (Columbia University, New York, USA) (Caton et al., 2007) y ratones SHIP-1^{flox/flox} cedidos por W. Kerr (SUNY Upstate University, Syracuse, New York, USA) (Wang et al., 2002a).

3.1.c) Inhibidores.

En este trabajo se han utilizado diferentes inhibidores para los distintos estudios desarrollados. Las concentraciones de dichos inhibidores han sido previamente testadas para no comprometer la viabilidad de las DCs (anexo 1). En los ensayos se ha usado una concentración por encima y otra por debajo de las indicadas. Se han utilizado siempre 45 minutos antes de la aplicación de los distintos estímulos.

La laminarina (sigma) es un $\beta(1-3;1-6)$ -glucano soluble procedente de un alga denominada *Laminaria digitata*, capaz de unirse a Dectin-1 sin estimular la señalización vía dicho receptor y por tanto bloquea la unión de otros $\beta(1-3)$ -glucanos particulados. (Brown et al., 2002; Gantner et al., 2005) Se ha utilizado a una concentración saturante de 200 $\mu\text{g/ml}$.

El R-406 (Hözel diagnostic) se ha utilizado a 3 μM y el piceatannol a 25 μM . Ambos son inhibidores de la tirosina quinasa de bazo (Syk).

El Cloruro de difenilén iodonio o DPI (Sigma) es un inhibidor de la NADPH oxidasa. Se ha utilizado a 5 μM .

3.2- Estudios de proteómica.

Para los estudios de proteómica de “pull-down” se inyectaron ratones subcutáneamente con el melanoma B16 FIt-3L, que expresa dicho ligando para expandir el conjunto de DCs en el bazo (Mach et al., 2000). Tras 10-12 días, se aislaron las células CD11c⁺ por selección magnética positiva tras la incubación del homogenado de bazo con microesferas CD11c (Miltenyi Biotech). Tras la purificación, las células dendríticas se lisaron en buffer de lisis comercial con 1% NP-40. Estos lisados fueron incubados con esferas magnéticas de estreptavidina (Sigma) conjugadas con péptidos biotinilados que representaban el dominio intracelular de Dectin-1, en su conformación nativa o doblemente fosforilada en las tirosinas 3 y 15 y como control CD69 de ratón.

La estructura de dichos péptidos es la siguiente: cola intracelular de Dectin-1 (NH₂-MKYHSHIENLDEGYTQLDFSTQDIHKR-C; donde la lisina (K) en C-terminal está biotinilada), doblemente fosforilada en tirosina (Y) o no fosforilada y CD69

(NH2-MDSENC SITENSSSHLERGQKDHGTSIHFEK-C, donde la lisina (K) en C-terminal está biotinilada).

Las proteínas que interactuaban con dichos péptidos fueron analizadas por espectrometría de masas y *western blot* con anticuerpos anti- SYK, anti SHIP-1 (Santa Cruz), anti SHP-2 y anti-Lyn (Cell Signaling).

Para el estudio de asociación directa de SHIP-1 y Dectin-1 fosforilado se emplearon los péptidos descritos anteriormente unidos a esferas de estreptavidina magnéticas y una variante de SHIP-1 truncada en su dominio C-terminal (tSHIP-1) clonada y purificada en el laboratorio de W. Kerr. Crecientes concentraciones de esta proteína recombinante fueron incubadas con péptidos que representaban el dominio intracelular de Dectin-1 en diferentes conformaciones: nativa, fosforilada en la tirosina distal 3 (Y3), en la tirosina proximal 15 (Y15) o doblemente fosforilada en ambas (YP3, 15). SHIP-1 unido a dichos péptidos fue detectado por *western blot* empleando un anticuerpo contra el dominio N-terminal de SHIP-1 (SHIP-1 (V-19); Santa Cruz). Este experimento se realizó dos veces.

3.3- Generación de transfectantes transitorios en células CHO-K1.

3.3.a) Clonaje de Dectin-1 WT Y Dectin-1 Y15F en pmCherry-C1.

La expresión de Dectin-1 se obtuvo a partir de PCR empleando como molde el vector pcDNA.3.1 conteniendo Dectin-1 WT o Dectin-1 Y15F (generado desde este mismo pcDNA.3.1 Dectin-1 WT por mutagénesis dirigida de la tirosina (Y) 15 a fenilalanina (F) empleando el kit de mutagénesis de Agilent Technologies y los oligonucleótidos 5'-TTTCCCCTCGAGCCAAATATCACTCTCATATAGA-3' y 5'-TTTCCCGAATTCTTACAGTTCCTTCTCACAGATAC-3'. Seguidamente fue clonado entre los sitios de restricción Xho I y EcoRI en el vector pmCherry-C1 (Clontech)

3.3.b) Clonaje de SHIP-1 en pEGFP-N1.

La expresión de SHIP-1 fue obtenida por PCR empleando como molde el vector de expresión eucariota SHIP-1 pExpress (Invitrogen) con los oligonucleótidos 5'- TTTCCCCTCGAGCTATGCCTGCCATGGTCCCTGG-3' y 5'-

TTTCCCGAATTCGCAGGTCTTCTTCAGAGATCAGTTTCTGTTCGCGGCCGCAC
TGCATGGCAGTCCTGCCA-3' fusionado a C-myc (subrayado en la secuencia del oligonucleótido). El DNA resultante fue clonado entre los sitios de restricción Xho I y EcoRI en el vector pEGFP-N1 (Clontech), tras su clonaje en pGEMT como vector intermediario.

3.3.c) Clonaje de Syk en pEGFP-N1.

La expresión de Syk fue amplificada por PCR empleando como molde cDNA de la línea celular de macrófagos RAW-264.7, utilizando los oligonucleótidos 5'-CTCGAGACCATGGCGGGAAGTGCTGTGG-3' y 5'-GAATTCGGTTAACCACGTCGTAGTAGT-3'. El producto de PCR fue clonado en pGEMT como vector intermediario y posteriormente en el vector pEGFP N1 (Clontech) entre los sitios de restricción Xho I y EcoRI.

3.3.d) Transfección transitoria en células CHO-K1 para microscopía confocal.

Células CHO-K1 fueron mantenidas en medio completo Ham's F-12 Nutrient Mix (GIBCO) suplementado con 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 2mM de L-Glutamina. Dichas células sembradas en portaobjetos fueron transitoriamente co-transfectadas con las construcciones previamente descritas: Dectin-1 WT (D-1 WT) o Dectin-1 mutante donde la tirosina 15 ha sido mutada a fenilalanina (D-1 Y15F) y Syk o SHIP-1 en cada caso. Para la realización de la transfección se empleó Lipofectamina LTX (Sigma). A las 24-48 h de la transfección se añadió zymosan a 10 µg/ml (Sigma), se centrifugó para asegurar el contacto célula-partícula y se incubó durante 20 min a 37 °C. Posteriormente, las células fueron fijadas con 0.5% PFA durante 30 minutos y los cristales fueron montados con Prolong (Molecular Probes) para su posterior análisis en el microscopio confocal.

3.3.e) Adquisición de imágenes en microscopio confocal y análisis.

Las imágenes fueron obtenidas con una unidad láser confocal de barrido TCSSP5 Leica unido a un microscopio invertido de epifluorescencia DMI6000B equipado con un objetivo de inmersión de aceite HCX PL APO lambda blue

63X/1.4 NA (apertura numérica) y utilizando el software de adquisición Las-AF (Leica Microsystems).

Los análisis de relocalización fueron realizados utilizando los siguientes programas de análisis:

ImageJ se utilizó para obtener el histograma de intensidad de fluorescencia en el canal verde (Syk o SHIP-1) y en el canal rojo (receptores) de las secciones transversales seleccionadas en los fagosomas (Figura R4).

El índice de enriquecimiento (IE) de Syk o SHIP-1 GFP en la zona que colocaliza con el receptor (canal rojo) fue obtenido utilizando el software Imaris (Bitplane, Zurich, Switzerland) (Figura R5) como se describe a continuación. Se definieron tres volúmenes un volumen para el canal rojo coincidente con el receptor (IMVR), un volumen para definir la célula (IMVC) y un tercer volumen obtenido tras eliminar el volumen correspondiente al receptor al volumen de la célula (IMVC-IMVR).

El índice de enriquecimiento (IE) de SYK o SHIP-1 es obtenido con el siguiente cociente:

IE = IMGR / (IMGC - IMGR); donde se ha definido **IMGR** como la intensidad media de fluorescencia del efector GFP que colocaliza con el receptor y **IMGC** como la intensidad media del efector GFP en toda la célula

3.4- Obtención de DCs derivadas de médula ósea (BMDCs) y caracterización mediante citometría de flujo.

Las DCs derivadas de médula ósea con factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) se obtuvieron siguiendo otro protocolo previamente descrito (del Fresno et al., 2013). Este tipo celular va a ser similar a las DCs inflamatorias que se reclutan en situaciones de inflamación. Las GM-DCs fueron obtenidas desde suspensiones de médula ósea tras cultivo en placas Petri de 150-mm no tratadas in medio RPMI 1640 completo, suplementado con, 10% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de estreptomicina, 50 μM de β -Mercaptoetanol y 20 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ de GM-CSF (Peprotech). Las células fueron recogidas a día 8 de la diferenciación y purificadas

por selección inmunomagnética positiva tras incubación con microesferas conjugadas a anti-CD11c (Miltenyi Biotech). Tras la selección positiva, las GM-DCs obtenidas fueron caracterizadas fenotípicamente por citometría de flujo con anticuerpos de eBioscience como células CD11c⁺ MHCII⁺Ly6G⁻ con una pureza > 95%. Para ello se utilizaron los anticuerpos de eBioscience anti-CD11 APC, anti-I-A^b (MHC II) FITC y anti-Ly6G V450. La expresión de Dectin-1 fue analizada con anti CLEC7a/Dectin-1 (2A11) (Acris Antibodies) biotinilado y estreptavidina APC de eBioscience.

3.5- Ensayos de fagocitosis.

DCs teñidas con 5µM Cell Violet a 37°C durante 10 minutos y posteriormente lavadas con PBS fueron sembradas en placas de 24 pocillos no tratadas a 250.000 GM-DCs /ml por pocillo en RPMI completo. Tras el pretratamiento con laminarina (200µM) durante 45 min en aquellas condiciones en que se indique, las DCs fueron expuestas a diferentes estímulos como CFSE- HKC (2.5 µM), CFSE- *C.albicans* (20 µM), o esferas conjugadas a FITC como control durante 15 o 30 minutos a 37°C. El ratio empleado fue de 3 o 1 levaduras por cada célula dendrítica (3:1 o 1:1) como se indica en cada caso. Las células fueron recuperadas de las placas con PBS-5mM EDTA. Tras lavar exhaustivamente con PBS frío, se añadió a las células tripsina-EDTA (0.25%) de Gibco durante 10 minutos para eliminar las levaduras no internalizadas. Las GM-DCs fueron resuspendidas en PBS frío y pasadas a hielo para analizar inmediatamente mediante citometría de flujo. Cuando no fueron analizadas inmediatamente se fijaron en PFA 4% (10 min).

3.6- Inmunofluorescencias.

Para los análisis de inmunofluorescencia, las DCs fueron sembradas sobre cubreobjetos y HKC teñida con 2.5 µM de Cell Violet fue añadida a un ratio de 5:1 durante 3 o 15 minutos y centrifugada para bajar y sincronizar estímulo. A dichos tiempos las células fueron lavadas y fijadas con PFA al 4% (10 min, RT) en PBS, seguida de una permeabilización con PBS- 0.2% Tritón X-100 y un bloqueo de PBS-5% BSA-0.2% Tritón X-100. Para la tinción de SHIP-1 se utilizó anticuerpo anti SHIP-1 (P1C1, Santa Cruz) a 4°C durante una noche y un anticuerpo anti

mouse 647 como secundario. Para la tinción de P-Syk se empleó un anticuerpo anti-fosfo Syk Tyr525/526 (C87C1, Cell Signaling) a 4°C durante la noche, junto con un amplificador de la señal TSA kit 568 (Molecular Probes)

La intensidad media de fluorescencia (IMF) de la tinción de P-Syk alrededor de todas las partículas de HKC fue analizada en un total de 72 imágenes de BMDCs WT o CD11cΔSHIP-1 en colaboración con la Unidad de análisis de imagen del CNIC (Figura R10). Para llevar a cabo el análisis se usaron 2 canales por imagen: C1_*Candida* y C2_P-Syk. El procesamiento y análisis de imágenes fue hecho usando algoritmos de diseño personalizado en el software *Definiens Developer XD* (Definiens AG, Munich, Alemania). *Candida* fue segmentada desde el canal C1_*Candida* aplicando un umbral automático. Este umbral fue calculado utilizando una combinación de métodos basados en histogramas que dividen el conjunto completo de píxeles para cada genotipo en dos subconjuntos, por lo que la heterogeneidad se incrementa a un máximo. Entonces se aplicó un algoritmo de cuenca a *Candida* con el fin de dividir cada una de ellas y asegurar la separación de *Candidas* adyacentes. Aquellas partículas de *C. albicans* con un número de píxeles más pequeños que el cuantil 60 se descartaron. Para cada *Candida*, se consideró una región de anillo, usando una dilatación morfológica de 5 píxeles, de tal manera que la región que cubre una distancia de 0.565 micras alrededor de la *Candida* en todas las direcciones, evitando otra *Candida* a fin de no calcular P-Syk interno. Dentro de esta región, se calculó el valor medio del canal C2_P-Syk y se asigna a cada *Candida* en particular

3.7- Ensayos bioquímicos analizados por western blot.

Las células se sembraron en placas de cultivo no tratadas en medio sin suero durante 4 h para ajustar los niveles basales de fosforilación y tras someterlas a los tratamientos correspondientes y/o HKC a los tiempos indicados, las células fueron recolectadas y lisadas en RIPA (50mM Tris pH7.5, 1% NP-40, 0.5% desoxicolato, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ and 2 mM Na₄P₂O₇) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche, Basel, Suiza). Los lisados celulares fueron resueltos mediante electroforesis en condiciones reductoras en geles Mini-PROTEAN TGX PRECAST (BIO-RAD, Hercules, CA) y las proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa (BioRad).

La activación de ERK, p38 y Syk y p40 phox fue detectada por anticuerpos específicos anti-fosfo-p44/42-MAPK / anti-p44/42-MAPK (Cell Signaling), anti-fosfo-p38/ anti-p38 (Cell Signaling), anti-fosfo-Erk/ anti-Erk (Cell Signaling), anti-fosfo Syk (tyr523/526) (Cell Signaling) / anti Syk (Santa Cruz) y anti-fosfo p40 phox (Thr154) (Cell Signaling).

La delección de SHIP-1 fue detectada con anti-SHIP-1 (Santa Cruz). Los niveles de I κ B- α se detectaron con anti-I κ B- α (Cell Signaling). Como controles de carga se han empleado anti-Vinculina (Sigma) y anti-actina (Santa Cruz). Para visualizar y cuantificar dichas proteínas mediante fluorescencia en el dispositivo Odyssey (LI-COR, Lincoln, NE) se utilizaron anticuerpos secundarios Alexa Fluor-680 o Qdot-800 (LI-COR).

3.8- PCR cuantitativa

BMDCs fueron estimuladas como se indica y se empleó el kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) para la extracción de mRNA. El cDNA se obtuvo con el kit de transcripción reversa de cDNA High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA). La PCR cuantitativa fue realizada en un dispositivo 7900-FAST-384 de Applied Biosystems utilizando la master mix GoTaq qPCR de Promega (Madison, WI). Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por Sigma y son los siguientes: SHIP-1 exon-1 (5'-AGCTGGTAGGAGCAGCAGAG-3' y 5'-AGTAGCTCCTCTGCCTTGGA- 3'); Egr-3 (5'-CAACGACATGGGCTCCATTC-3' y 5'-GGCCTTGATGGTCTCCAGTG- 3').

3.9- Estimulación y análisis de secreción de citoquinas mediante ELISA.

Las DCs fueron sembradas a 2×10^5 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano y estimuladas con distintas dosis de HKC durante 24h. Los sobrenadantes fueron recolectados y distintas citoquinas como TNF, IL6, IL12p40, IL2 (eBioscience) e IL10 (BD OptEIA) fueron medidas por ELISA según los protocolos del fabricante.

En el caso de la producción de la IL1 β la estimulación es necesariamente con *C. albicans* viva (Gross et al., 2009). En este caso las células se sembraron en placas de 24 pocillos a 4×10^5 células por pocillo en 1 ml y fueron estimuladas con

3 levaduras por célula (3:1) durante 4 horas. Los sobrenadantes fueron recolectados y ensayados con el kit IL1 β de R&D según el protocolo del fabricante.

3.10- Detección de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Para la medición de especies reactivas del oxígeno (ROS) se empleó un método de quimioluminiscencia que emplea luminol como previamente ha sido descrito (Gantner et al., 2003). En concreto en nuestro caso se utilizó L-012 de Wako a una concentración final de 50 μ M. El ensayo consiste en plaquear 1×10^5 DCs por pocillo en placas de luminómetro de 96 pocillos (Costar) en 200 μ l de medio RPMI completo. En el caso del uso de inhibidores fueron añadidos a las concentraciones previamente descritas en el apartado 3.1.c, de material y métodos, 45 minutos antes de añadir la HKC (10:1) o PMA (250 ng/ml final) con el luminol utilizado como control positivo para normalizar. Las medidas fueron realizadas en intervalos de 5 min durante 60 min y los resultados expresados en unidades relativas de luz por segundo (RLU/s, del inglés *Relative Lights Units*) y por duplicado. Los valores de producción de ROS fueron normalizados a la máxima producción de ROS inducida por PMA (Sigma).

3.11- Ensayos de eliminación de *C. albicans* por DCs.

Para determinar la capacidad candidicida (de eliminación o aniquilamiento de *C. albicans*) de las GM-DCs deficientes en SHIP-1 en comparación con GM-DCs WT se realizaron diferentes aproximaciones descritas a continuación.

3.11.a) Unidades formadoras de colonias

Para realizar estos ensayos, *C. albicans* viva fue incubada con las DCs (3:1) durante al menos 4 h a 37 °C en placas de 24 pocillos.. Tras recoger el medio extracelular y lisar las GM-DCs con agua para recuperar las *C. albicans* vivas del interior celular, se hicieron diluciones seriadas de ambos compartimentos, extracelular e intracelular y eran sembradas sobre placas de agar YPD 24h a 30°C para determinar las unidades formadoras de colonias (CFUs, del inglés *Colony Forming Units*). El porcentaje de aniquilamiento de cada tipo de célula dendrítica fue expresado como la reducción del porcentaje de CFUs existentes entre el co-

cultivo de las GM-DCs con la *C. albicans* versus el cultivo simultáneo sólo con *C. albicans*.

3.11.b) MTT.

Este tipo de ensayo para determinar la viabilidad de *C. albicans* tras exposición a BMDCs también ha sido previamente descrito para determinar la carga fúngica *in vitro* (Levitz and Diamond, 1985). En este caso, tras la incubación conjunta de *C. albicans* y GM-DCs y (3:1) durante 4 h a 37°C en RPMI sin rojo fenol. Tras la incubación se eliminó el medio y se añadió durante 5 minutos 2.5% de deoxicolato de sodio para lisar las GM-DCs. Posteriormente, se lava cuidadosamente la placa y tras comprobar que las hifas están todavía pegadas, se incuban durante 3h a 37°C con 1ml de solución con 0.5 mg/ml de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de Sigma.

Este compuesto de color amarillo reacciona con las deshidrogenasas fúngicas formando cristales de formazan de color púrpura que se extraen de la placa tras dos lavados por adición de 500 µl de 0.04 HCl en isopropanol absoluto. Esta solución se mezcla apropiadamente y tras incubar 5 minutos a 37°C y se mide a 540-570 nm. Puesto que este compuesto reacciona con las deshidrogenasas fúngicas formando cristales como se ha dicho previamente, valores mayores de absorbancia indicaran una mayor presencia de hifas y por tanto, una menor capacidad candidicida de las DCs.

3.11.c) PAS / Hematoxilina.

GM-DCs sembradas sobre cristales fueron co-incubadas con *C. albicans* (3:1) durante 3 h a 37°C, fijadas con PFA 4% durante 10 min y posteriormente teñidas empleando PAS (del inglés, Periodic Acid Schiff) / hematoxilina, una tinción específica para glucanos presentes en las hifas. La tinción PAS consiste en tratar la muestra durante 5 min con ácido periódico al 1% que oxida los 1,2-glicoles formándose grupos aldehído. Tras lavar se trata la muestra con reactivo de Schiff con el que los aldehídos reaccionan dando un color rojo luminoso y se vuelve a lavar el exceso. Tras la tinción de las células con hematoxilina 30s y lavar, las muestras de células e hifas fueron deshidratadas en alcohol y montadas para su visualización en el microscopio de luz visible.

3.12- Modelos de Infección *in vivo* con *C. albicans*.

3.12.a) Modelo de candidiasis sistémica.

Los ratones fueron infectados por vía intravenosa en la cola con *C. albicans* a una dosis de 1×10^5 y 24 horas después de la infección se extrajo el riñón izquierdo para plaquear el homogenado en diluciones seriadas en placas de YPD y determinar así la carga fúngica en el riñón mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (CFUs).

3.12.b) Modelo de inyección intraperitoneal con *C. albicans* o Curdlan.

Los ratones fueron inyectados por vía peritoneal con *C. albicans* a una dosis de 10^5 y tras 4h se recolectó el infiltrado inflamatorio mediante lavados con PBS 5mM de EDTA frío. Las poblaciones inflamatorias celulares fueron contadas y analizadas por citometría de flujo para determinar el reclutamiento de neutrófilos ($N\phi$, Ly6G⁺), la desaparición de macrófagos residentes ($M\phi$, F4/80) y el número de células dendríticas (DCs, CD11c⁺).

3.13- Análisis estadísticos.

El análisis estadístico fue realizado utilizando el software Prism (GraphPad Software, Inc).

La significación estadística para comparación entre dos grupos de muestras fue determinada utilizando el test estadístico t student de dos colas para valores no pareados. Para comparación de más de dos grupos, se utilizó el análisis de varianza unidireccional ANOVA y corrección de Bonferroni.

El nivel de significación fue fijado como: * $P < 0,05$; ** $< 0,01$ y *** $< 0,001$. A menos que se indique lo contrario todos los experimentos mostrados en la tesis han sido realizados un mínimo de 3 veces y los datos presentados muestran los valores medios \pm error estándar de la media (SEM, del inglés *Standard Error of the Mean*).

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1-Estudio del proteoma que interacciona con el dominio intracelular de Dectin-1.

En un esfuerzo por encontrar efectores tempranos asociados al dominio citoplasmático de Dectin-1, decidimos aplicar una aproximación proteómica. Para investigar el proteoma que interacciona con el dominio citosólico de Dectin-1 seguimos el diseño experimental indicado en la Figura R1.

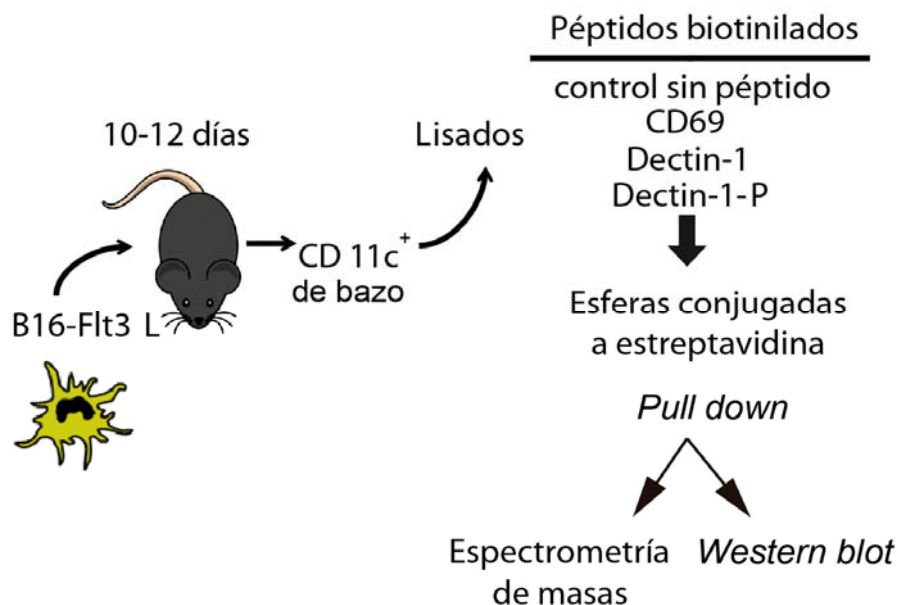


Figura R1. Diseño experimental para análisis del proteoma reclutado por el dominio citoplasmático de Dectin-1.

Los ratones fueron inyectados con la línea B16-Flt3L que estimula, tras 10-12 días fueron células CD11c⁺ (DCs). Se hizo una inmunoprecipitación con lisados de DCs y microesferas conjugadas a estreptavidina unidas a péptidos biotinilados correspondientes a los dominios citoplasmáticos indicados. Las proteínas recuperadas fueron analizadas por espectrometría de masas y *western blot*.

Para ello, se inyectaron subcutáneamente ratones C57BL/6 con células del melanoma B16 Flt-3L, que expresa dicha citoquina para expandir el conjunto de DCs en el bazo (Mach et al., 2000). Tras 10-12 días, se aislaron las células CD11c⁺ del bazo (correspondientes a DCs) y se lisaron. Estos lisados fueron incubados con

microesferas conjugadas a estreptavidina unidas previamente a péptidos biotinilados que representaban el dominio intracelular de Dectin-1 de ratón, tanto en su conformación nativa como doblemente fosforilada en las tirosinas 3 y 15, usando como control negativo péptidos correspondientes al dominio intracelular de CD69 de ratón. Las proteínas que se retuvieron asociadas a las microesferas conjugadas a los péptidos tras 15 lavados fueron analizadas por espectrometría de masas y *western blot*. En el Anexo 2 se incluye un listado de todas las proteínas identificadas, mostrándose una representación de las más destacadas en la Tabla R1.

Nombre de la proteína	Número de identificación	Sin péptido	CD69	Dectin-1	Dectin-1-P
Quinasas					
Syk	gi 56550045	ND	ND	ND	20
Hck	gi 34734056	ND	ND	ND	8
Lyn	gi 33859588	ND	ND	ND	3
Fosfatasas					
SHIP 1	gi 6754356	ND	ND	ND	30
SHP-2	gi 6755228	ND	ND	ND	5
SHP-1	gi 7305133	ND	ND	ND	3

Tabla R1. Tabla resumen de quinasas y fosfatasas reclutadas por el dominio citoplasmático de Dectin-1 mediante espectrometría de masas.

En la tabla está representado el número de péptidos únicos de las proteínas seleccionadas con mayor representación dentro de las proteínas detectadas mediante espectrometría de masas por interaccionar con Dectin-1, Dectin-1-P y como controles CD69 de ratón y control sin péptido. (ND: péptidos no detectados). Los resultados corresponden a cinco experimentos.

En el caso de los péptidos correspondientes a Dectin-1 fosforilado la tirosina quinasa Syk fue una de las proteínas asociadas más representadas (Tabla R1), confirmando datos previos que mostraron dicha asociación (Rogers et al., 2005). Otras proteínas también detectadas fueron las quinasas de la familia Src, como Hck y Lyn, cuya interacción con Dectin-1 ha sido ya previamente descrita tras la activación del receptor (Elsori et al., 2011). De manera sorprendente, se detectó también la interacción de fosfatasas como Shp-1 y Shp2, siendo SHIP-1 la proteína que interaccionó con mayor número de péptidos. Todas estas interacciones fueron

identificadas únicamente en presencia del péptido fosforilado correspondiente al dominio citosólico de Dectin-1, no siendo detectadas en presencia del péptido nativo de Dectin-1 o del péptido de CD69.

Estos resultados fueron corroborados por *western blot* (Figura R2), técnica que detectó algunas de las proteínas, como Syk, Lyn, SHP-2 y SHIP-1, que observamos que interactuaban de manera específica con el péptido fosforilado del dominio citoplasmático de Dectin-1. Estos resultados sugieren que estos efectores tempranos podrían estar interactuando con el dominio intracelular de Dectin-1 tras su activación en la célula dendrítica.

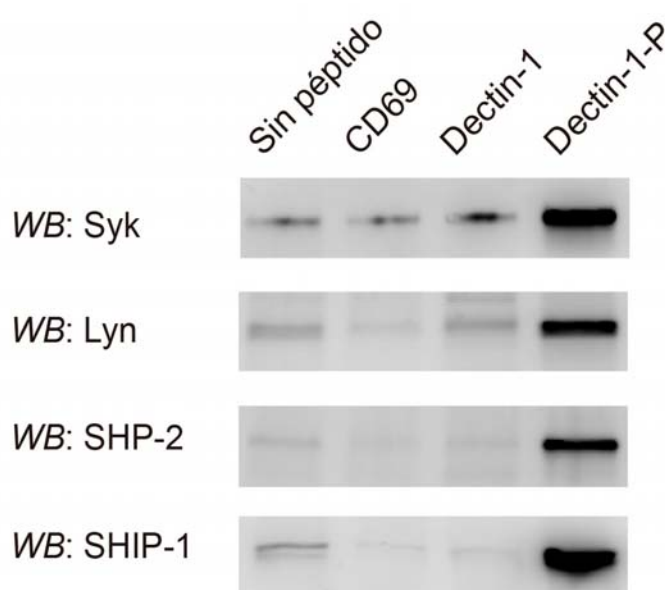


Figura R2. Análisis de una representación de proteínas que interactúan con el dominio citoplasmático de Dectin-1 mediante WB.

Proteínas seleccionadas del proteoma que interacciona con el dominio citoplasmático de Dectin-1 fueron seleccionadas y analizadas por *western blot* tras realizar una inmunoprecipitación de extractos totales de DCs utilizando péptidos de la cola citoplasmática de Dectin-1, Dectin-1-P y CD69 de ratón.

4.2- Estudio de la unión directa de SHIP-1 a Dectin-1 tras su activación.

4.2.a) Estudio de la unión entre SHIP-1 recombinante y el dominio citoplasmático de Dectin-1.

Decidimos analizar la unión de SHIP-1 a la cadena citoplasmática de Dectin-1 fosforilado, puesto que SHIP-1 fue la proteína más representada y la unión de fosfatasa al dominio hemITAM es novedosa. Para analizar si SHIP-1 se unía directamente a Dectin-1 fosforilado, empleamos concentraciones crecientes de una proteína recombinante de SHIP-1, una variante truncada en su dominio C-terminal (tSHIP-1), que fueron incubadas con péptidos correspondientes al dominio intracelular de Dectin-1 en diferentes conformaciones: nativa, fosforilada en la

tirosina distal 3 (P-Y3), en la tirosina proximal 15 (P-Y15) o doblemente fosforilada en ambas (P-Y3, 15). La unión de SHIP-1 a dichos péptidos se detectó por *western blot* empleando un anticuerpo contra el dominio N-terminal de SHIP-1 (Figura R3).

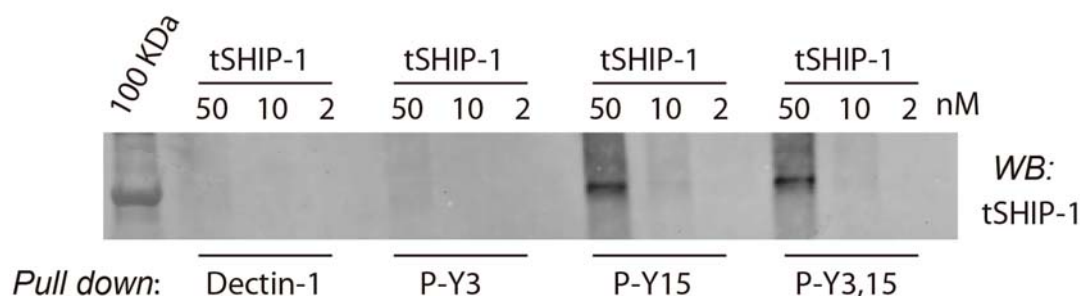


Figura R3. Análisis de interacción entre SHIP-1 recombinante y Dectin-1.

SHIP-1 recombinante truncado en su dominio C-terminal (t-SHIP-1, 104 kDa) se incubó a las dosis indicadas con péptidos correspondientes al dominio intracelular de Dectin-1 sin fosforilar, fosforilado en la tirosina 3 (P-Y3), en la tirosina 15 (P-Y15) o en ambas (P-Y3, 15) conjugados a microsfers. Tras la inmunoprecipitación, tSHIP-1 se detectó por *western blot*. En la figura se indica como referencia el marcador de peso molecular de 100 kDa y se muestra un experimento representativo de dos realizados.

Los resultados indican que tSHIP-1 recombinante se une directamente al dominio intracelular de Dectin-1 fosforilado y es interesante destacar que la fosforilación de la tirosina 15 proximal a la membrana, en el dominio hemITAM, es crucial para esta unión, mientras que la fosforilación de la tirosina en posición 3 no es necesaria.

4.2.b) Análisis de la unión entre SHIP-1 y Dectin-1 en transfectantes transitorios generados en células CHO-K1.

La quinasa Syk se asocia a la cadena citosólica de Dectin-1 y se relocaliza alrededor de la sinapsis fagocítica en la endocitosis de ligandos particulados específicos de Dectin-1 (Goodridge et al., 2011). Para abordar si SHIP-1 también se asocia al receptor Dectin-1 en células vivas y durante el proceso de fagocitosis de partículas con ligandos para Dectin-1, se generaron diferentes construcciones. Por un lado, el receptor Dectin-1 WT o Dectin-1 Y15 F donde la tirosina proximal 15 fue mutada a fenilalanina fusionados a proteínas rojas fluorescentes, *mCherry*. A su vez los efectores que queríamos testar, Syk, como control conocido de unión al

hemITAM fosforilado, y SHIP-1, se fusionaron a la proteína verde fluorescente, *GFP*. Dichas construcciones se emplearon para generar transfectantes transitorios en Células CHO-K1 con los receptores Dectin-1 WT (D-1 WT) o mutante (D-1 Y15F) y la quinasa Syk o la fosfatasa SHIP-1. Estas células fueron expuestas a 10 µg/ml de zymosan y la relocalización fue visualizada por microscopía confocal (Figura R4 y Anexos 3-6).

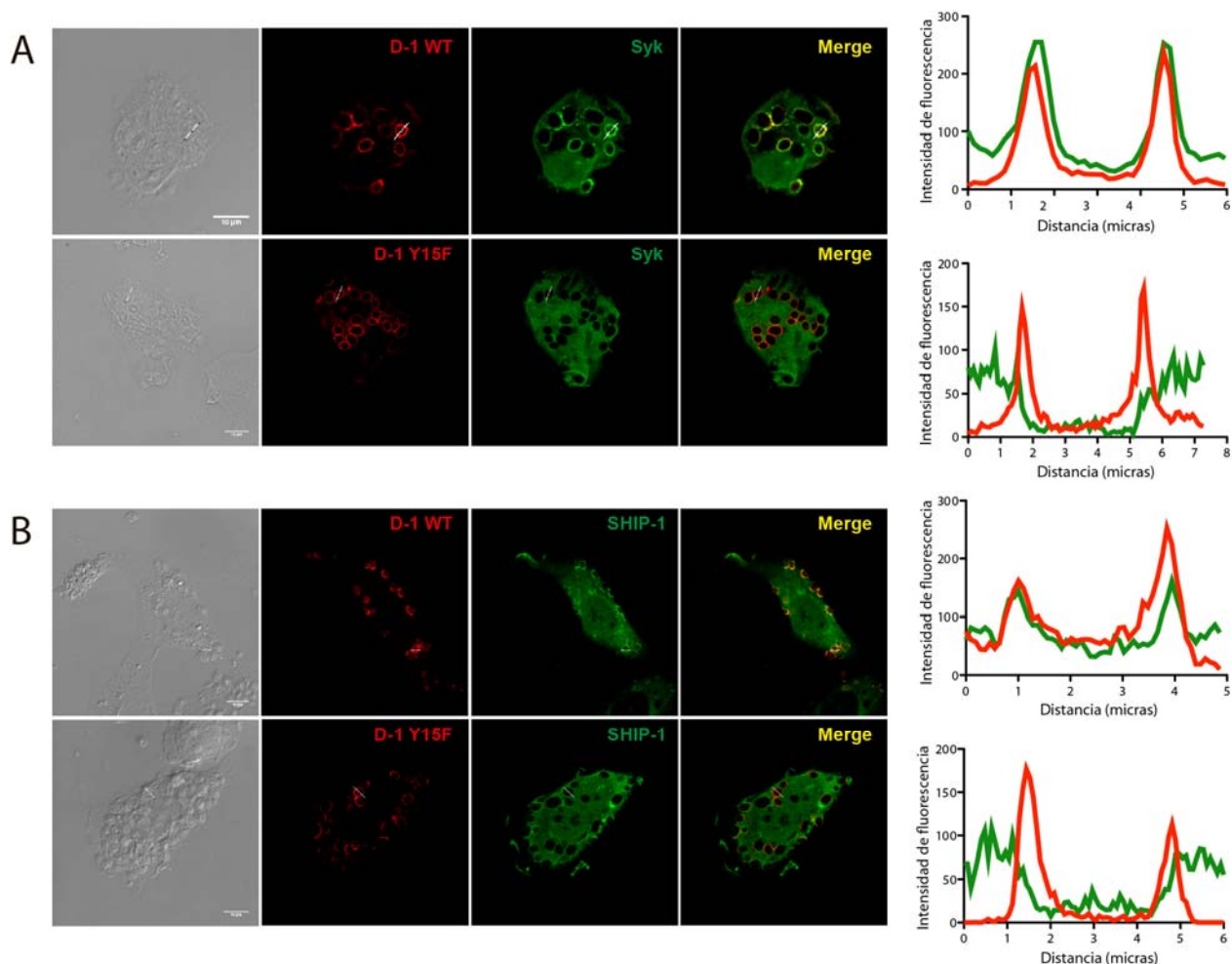


Figura R4. Estudio de colocalización de SHIP-1 y Dectin-1 en transfectantes transitorios.

Imágenes de microscopía confocal de célula CHO-K1 co-transfectadas transitoriamente con Dectin-1 WT *mCherry* o Dectin-1 Y15F *mCherry* como receptor y Syk-GFP o SHIP-1-GFP como efector. Los transfectantes se expusieron a partículas de zymosan y se fijaron 15 min más tarde para su análisis por microscopía confocal. Las imágenes muestran la colocalización de Syk (**A**) o SHIP-1 (**B**) con Dectin-1 WT (D1-WT) que no ocurre en Dectin-1 mutante en tirosina 15 (D1-Y15F). (**A-B**) Los histogramas indican la intensidad de fluorescencia de dichas proteínas en los canales rojo y verde a lo largo de la sección transversal seleccionada con una línea blanca en un fagosoma representativo de cada célula.

Se observó una relocalización de Syk alrededor de fagosomas conteniendo zymosan en células co-transfectadas con el receptor Dectin-1 WT, sin embargo, esto no se dio en células co-transfectadas con el receptor mutante Dectin-1 Y15F, puesto que la fosforilación de esta tirosina es esencial para la unión entre Dectin-1 y Syk (Rogers et al., 2005). El análisis de secciones transversales de la intensidad de fluorescencia en los fagosomas ilustra este proceso, donde el histograma muestra que la distribución de la fluorescencia de Syk sigue la misma distribución que el histograma del receptor WT, indicando la colocalización de Syk en la región del receptor. Sin embargo, esto no se detectó en presencia del receptor mutante Dectin-1 Y15F (Figura R4.A, Anexos 3 y 4).

Encontramos que SHIP-1 colocalizaba con Dectin-1 WT en los fagosomas conteniendo zymosan, pero no con Dectin-1 Y15F. El análisis de secciones transversales de los fagosomas ilustra que la distribución de la fluorescencia de SHIP-1 también sigue la misma distribución que el receptor WT indicando colocalización de ambos. Sin embargo, esto no ocurre tampoco con el receptor mutante (Figura R4.B, Anexos 5 y 6).

La cuantificación de esta colocalización se realizó mediante el análisis de las imágenes de microscopía confocal utilizando el software IMARIS. El índice de enriquecimiento (IE) de Syk o SHIP-1 en el área del receptor se obtuvo del cociente de la intensidad media de fluorescencia (IMF) del efector-GFP en el área del receptor, comparada con la intensidad media de fluorescencia del efector-GFP en el resto de la célula (Figura R5.A). La obtención de estas medidas se explica con detalle en el apartado 3.3.e de material y métodos. Este IE fue mayor, tanto para Syk como para SHIP-1 con células co-transfectados con Dectin-1 WT comparado con el receptor mutante (Figura R5.B).

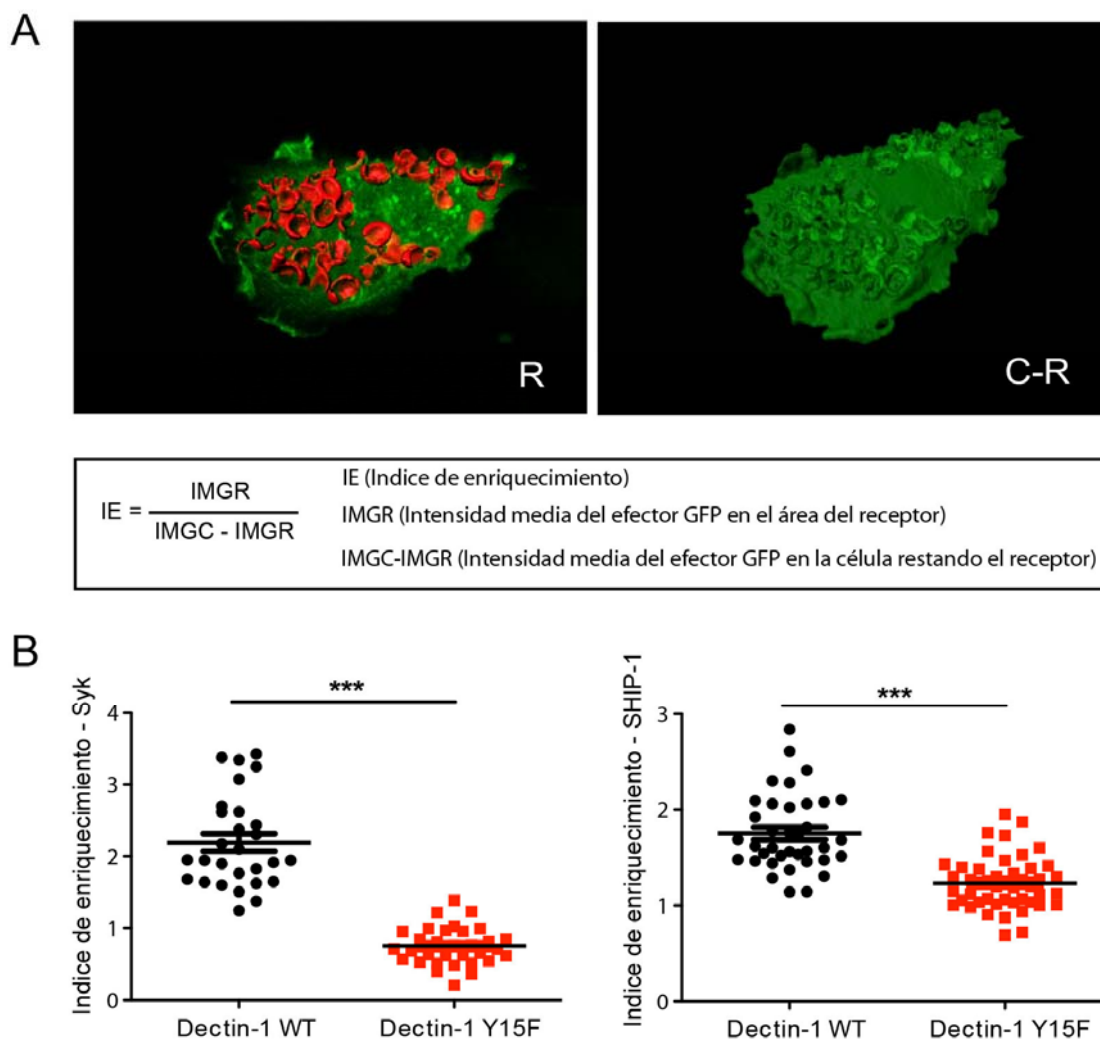


Figura R5. Análisis del índice de enriquecimiento de SHIP-1 o Syk en la región del receptor Dectin-1.

El índice de enriquecimiento (IE) de Syk EGFP o SHIP-1 EGFP en la zona que colocaliza con el receptor Dectin-1 Cherry se calcula a partir del cociente de la intensidad media de dichos efectores-GFP en la zona del receptor (IMGR) seleccionado con un volumen R (**A, panel izquierdo**) y la intensidad media del efector-GFP en el resto de la célula (IMGC-IMGR) obtenida a partir de otro volumen que coincide con la célula y excluye el volumen del receptor (C-R) (**A, panel derecho**). Representación del índice de enriquecimiento de Syk (**B, panel izquierdo**) y SHIP-1 (**B, panel derecho**) en la región del receptor Dectin-1 WT frente a Dectin-1 Y15F.

Estos resultados indican que Syk y SHIP-1 se relocalizan al receptor Dectin-1 tras la unión al ligando, siendo este reclutamiento dependiente de la tirosina 15.

4.3- Estudio del papel funcional de SHIP-1 en respuesta a ligandos específicos de Dectin-1 en DCs.

4.3.a) Generación de ratones CD11c Δ SHIP-1 para el estudio del papel de SHIP-1 en DCs.

Puesto que la unión de SHIP-1 a Dectin-1 fosforilado fue detectada inicialmente en los ensayos proteómicos descritos en el punto 4.1 de resultados empleando DCs, decidimos generar ratones CD11c^{cre/+} SHIP-1^{flox/flox} (CD11c Δ SHIP-1) por entrecruzamiento de ratones CD11c^{cre/+} y ratones SHIP-1^{flox/flox}. En estos ratones, SHIP-1 se elimina específicamente en células que expresan CD11c. El estudio de ratones CD11cCre YFP^{flox} ha mostrado que el promotor usado favorece la expresión de Cre de manera intensa en DCs convencionales con alta expresión de CD11c, pero no en otros tipos celulares con expresión moderada de CD11c (Caton et al., 2007). Usando los ratones CD11c Δ SHIP-1 pretendemos estudiar el posible papel de SHIP-1 en la modulación de la respuesta a ligandos específicos de Dectin-1, específicamente en DCs.

Primeramente, se realizó la caracterización general de estos ratones, puesto que resultados previos en ratones SHIP-1^{-/-} (deficientes en SHIP-1) mostraron las poblaciones de células mieloides afectadas en número o fenotípicamente (Helgason et al., 1998). Por otra parte, existe cierta controversia sobre el efecto de la delección de SHIP-1 en células dendríticas de ratones SHIP-1^{-/-}. Ha sido descrito que DCs diferenciadas *in vitro* con GM-CSF a partir de ratones SHIP-1^{-/-} mostraron una expansión incrementada junto con un fenotipo inmaduro que conduce a un defecto en la capacidad de presentación antigénica a células T (Antignano et al., 2010a). Sin embargo, otros autores no han encontrado un defecto en la activación de respuestas T alogénicas al purificar DCs de tejidos linfoides secundarios de estos ratones. Estos autores atribuyen este defecto en la capacidad antigénica de DCs a efectos extrínsecos de otros tipos celulares deficientes en SHIP-1. En concreto, a la incrementada expansión de células mieloides supresoras generadas en el medio inflamatorio de la línea germinal de ratones SHIP-1^{-/-} (Ghansah et al., 2004). Por ello, se realizaron estudios iniciales para caracterizar las principales poblaciones de sangre, bazo y médula ósea en homeostasis en ratones CD11c Δ SHIP-1 en comparación con ratones WT. En médula ósea y bazo las

distintas poblaciones fueron analizadas mediante citometría de flujo con los siguientes marcadores: neutrófilos ($CD11b^+ Ly6G^+$), linfocitos T ($CD3^+ CD8^+ CD4^-$; $CD3^+ CD4^+ CD8^-$) y dendríticas ($CD11c^+$). También se realizó el análisis bioquímico del suero de estos animales. Como se puede observar en la Figura R6, ninguna de las poblaciones analizadas, neutrófilos, linfocitos T o DCs muestran diferencias significativas en términos de números absolutos en la médula ósea (Figura R6.A), sangre (Figura R6.B) o bazo (Figura R6.C).

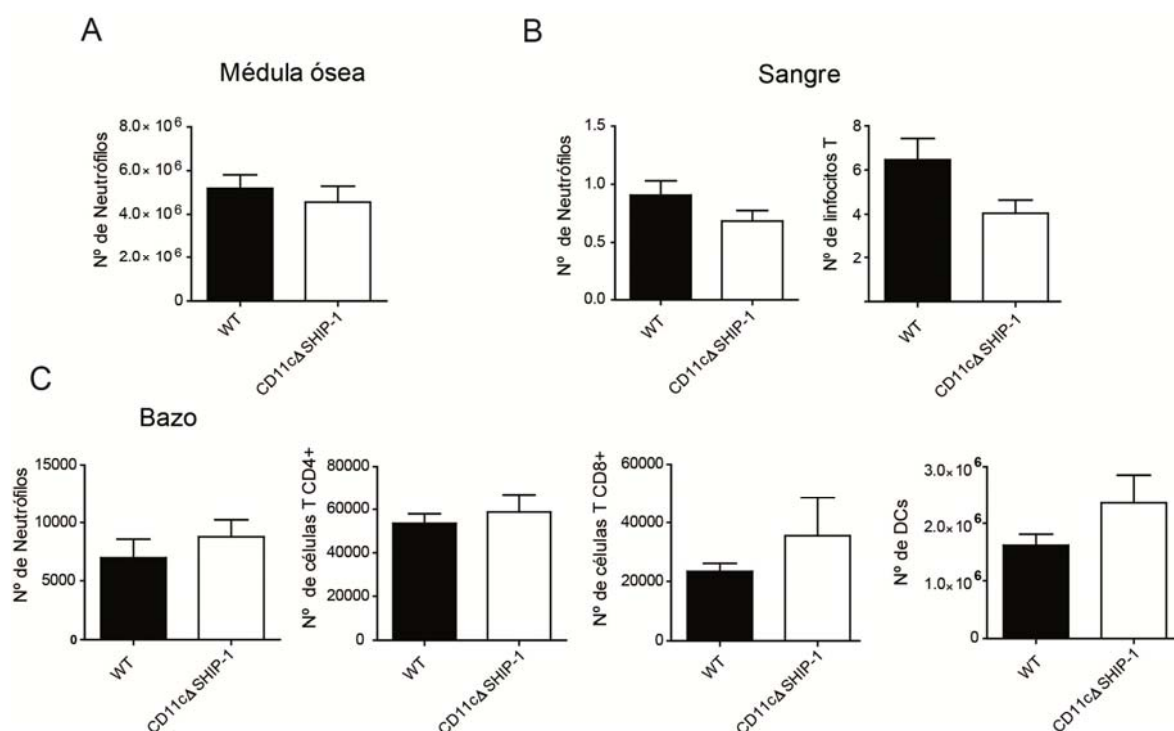


Figura R6. Caracterización de algunas poblaciones linfoides y mieloides en ratones CD11cΔSHIP-1.

En la figura se muestran las principales poblaciones en médula ósea (A), sangre (B) y bazo (C) de ratones CD11cΔSHIP-1 en comparación con sus homólogos WT. Los gráficos representan la media aritmética + SEM (n=5) y no se encontraron diferencias significativas.

4.3.b) Generación y caracterización de DCs derivadas con GM-CSF a partir de médula ósea de ratones CD11cΔSHIP-1.

Como modelo de estudio *in vitro*, se generaron cultivos *in vitro* con GM-CSF a partir de médula ósea (GM-DCs) de ratones CD11cΔSHIP-1 y WT, como se indica en el apartado 2.4 de material y métodos. La eficiencia de delección de SHIP-1 en estas células fue confirmada tanto a nivel de RNA mensajero por PCR cuantitativa (Figura R7.A) como a nivel de proteína mediante *western blot* (Figura

R7.B). La diferenciación de las GM-DCs fue normal en cuanto a niveles de expresión de CD11c y MHC II y el número de células recuperadas del cultivo tras 8 días de diferenciación con GM-CSF fue similar en CD11c Δ SHIP-1 y GM-DCs WT (Figura R7.C). Asimismo, la expresión de Dectin-1 fue igual en GM-DCs deficientes en SHIP-1 comparadas con GM-DCs procedentes de ratones WT (Figura R7.D). Estos resultados son importantes, puesto que se pretendía estudiar el papel de SHIP-1 en la señalización a través de Dectin-1.

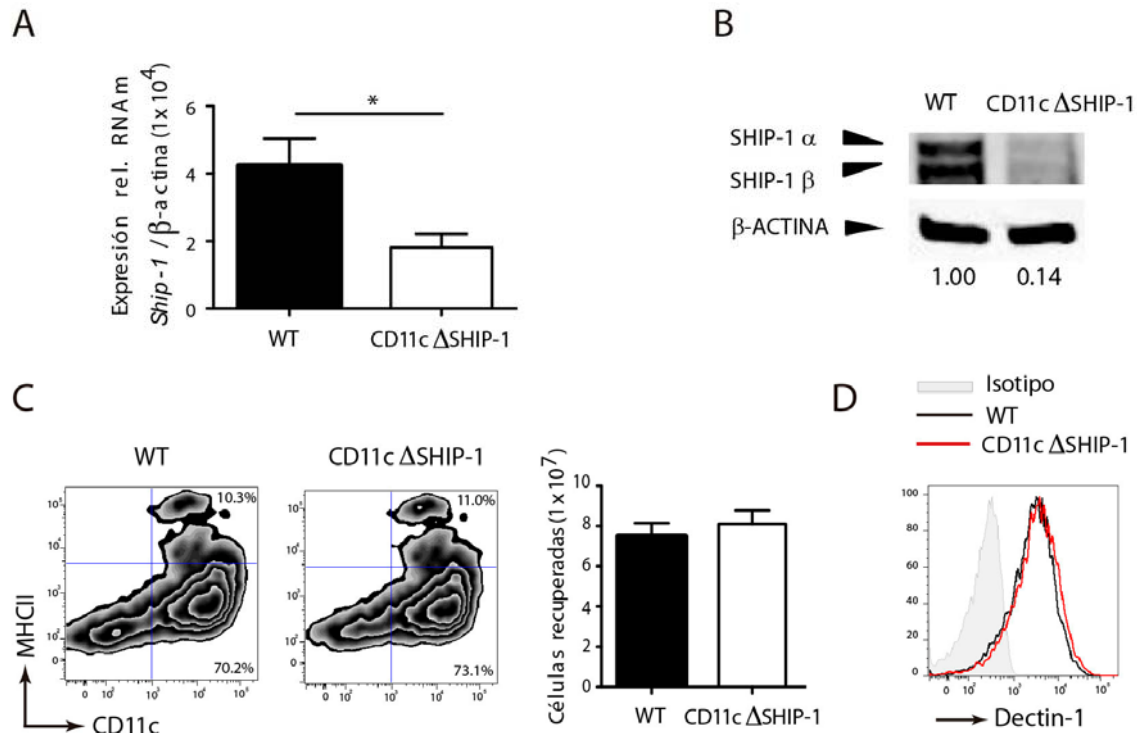


Figura R7. Caracterización de DCs deficientes en SHIP-1 derivadas de médula ósea con GM-CSF.

Tras 8 días de diferenciación de la médula ósea con GM-CSF, la delección de SHIP-1 en GM-DCs de ratones WT y CD11c Δ SHIP-1 se analizó a nivel de expresión de SHIP-1 en mRNA mediante PCR cuantitativa. Las barras muestran la media aritmética + SEM correspondiente a 4 experimentos (**A**). La diferenciación en ausencia de SHIP-1 fue similar en cuanto a marcadores CD11c y MHC II y a número de células recuperadas del cultivo donde las barras muestran la media aritmética + SEM correspondiente a ocho experimentos (**C**). La expresión de Dectin-1 fue igual en ambos tipos de GM-DCs (**D**).

Para llevar a cabo el estudio del papel de SHIP-1 en respuesta a ligandos de Dectin-1 en estas células utilizamos *Candida albicans* muerta por calor (HKC, del inglés *Heat-killed Candida*) como estímulo. Se ha descrito que el tratamiento con

calor potencia la exposición de los β -glucanos en la pared de *C. albicans*, lo que facilita su reconocimiento por Dectin-1. De esta forma, la mayoría de efectos funcionales en células mieloides desencadenados con HKC son dependientes de Dectin-1 (Gow et al., 2007; Netea et al., 2006a).

4.3.c) Análisis del papel de SHIP-1 en la fagocitosis de *C. albicans* mediada por Dectin-1.

Para comprobar si SHIP-1 modulaba la fagocitosis de *C. albicans* mediada por Dectin-1 se estimularon GM-DCs, WT o delecionadas en SHIP-1, con HKC teñida con CFSE. Tras una estimulación de 15 minutos a un ratio de 3:1 y 1:1 (HKC:DC), se analizó la fagocitosis mediante citometría de flujo. Para descartar que fuera una simple asociación, se realizó un tratamiento con tripsina que sólo dejó la HKC fagocitada, como se indica en materiales y métodos. (Figura R8).

Como se puede ver en la Figura R8.A, la ausencia de SHIP-1 en DCs no era relevante para la fagocitosis de HKC.

También se analizó el papel de SHIP-1 en la fagocitosis de HKC-CFSE, *C. albicans* viva teñida con CFSE y de esferas conjugadas a FITC como control de fagocitosis independiente de Dectin-1 tras una estimulación de 30 minutos a un ratio de 3:1 y se analizó la fagocitosis mediante citometría de flujo. De nuevo, la ausencia de SHIP-1 en DCs no afectaba la fagocitosis de HKC (Figura R8.B), la internalización de *C. albicans* viva (Figura R8.C) o la fagocitosis de microesferas de látex (Figura R8.D) en GM-DCs.

Para comprobar que el proceso de fagocitosis era dependiente de Dectin-1, se trataron las GM-DCs de manera previa al ensayo con laminarina, un glucano soluble que inhibe el reconocimiento de ligandos específicos de Dectin-1 (Brown et al., 2002). Únicamente la fagocitosis de HKC pero no la de *C. albicans* viva o microesferas de látex fue completamente dependiente de Dectin-1 (Figura R8.A).

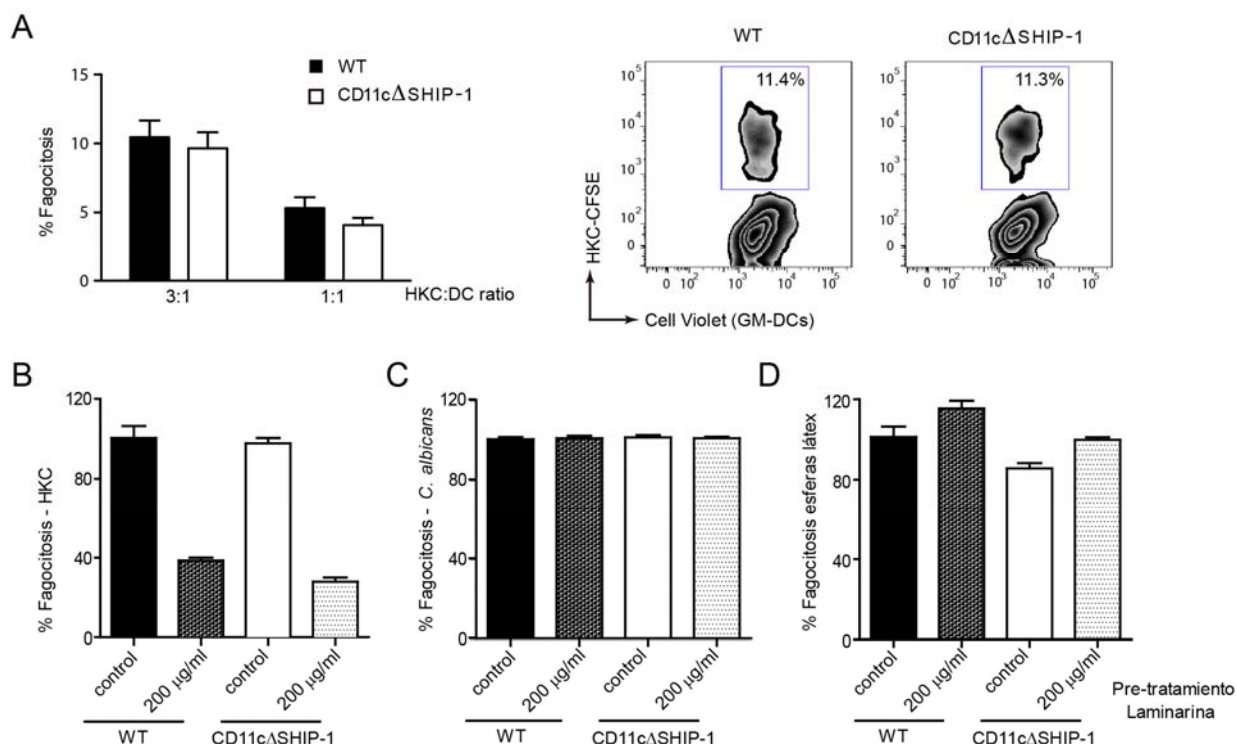


Figura R8. Análisis de fagocitosis en DCs deficientes en SHIP-1.

A) GM-DCs diferenciadas de médula ósea de ratones WT o CD11cΔSHIP-1 marcadas con Cell Violet, se estimularon con HKC marcada con CFSE durante 15 minutos a los ratios 3:1 y 1:1 (estímulo:DC) y la fagocitosis fue analizada mediante citometría de flujo. El panel izquierdo se representa el análisis del % de fagocitosis con cada uno de los ratios empleados y en el panel derecho se representa el análisis de citometría al ratio 3:1. Las GM-DCs también fueron pre-tratadas o no con laminarina a 200 μg/ml para comprobar que la fagocitosis es mediada por Dectin-1 y fueron expuestas a HKC (**B**), *C. albicans* viva (**C**), o microesferas de látex (**D**), al ratio 10:1 durante 45 minutos. Los análisis de fagocitosis muestran la media aritmética + SEM de cuatro experimentos independientes.

4.3.d) Estudio de la relocalización de SHIP-1 endógeno alrededor de fagosomas tras la fagocitosis de *C. albicans*.

Para estudiar si SHIP-1 endógeno también se relocalizaba alrededor de fagosomas que contienen HKC, se analizaron GM-DCs expuestas a HKC mediante microscopía confocal. Observamos una mayor concentración de SHIP-1 alrededor de fagosomas que contenían HKC (Figura R9), de manera similar al proceso de relocalización observado previamente en células CHO-K1 (Figura R4.B). Por lo tanto, estos datos nos sugieren un posible papel de SHIP-1 en respuestas mediadas por Dectin-1 en GM-DCs.

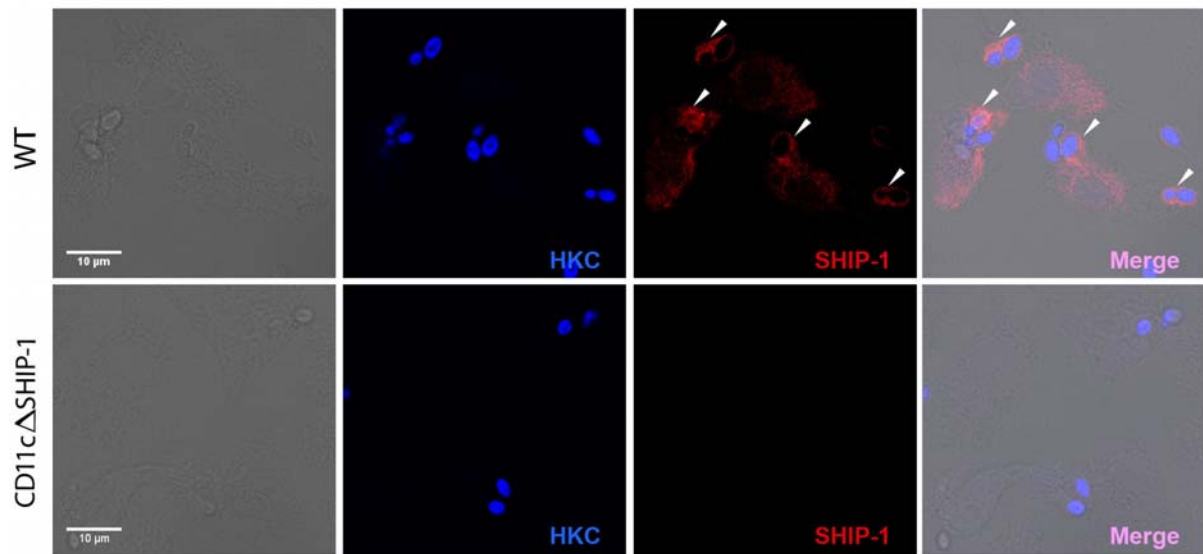


Figura R9. Análisis de colocalización de SHIP-1 y Dectin-1 en GM-DCs.

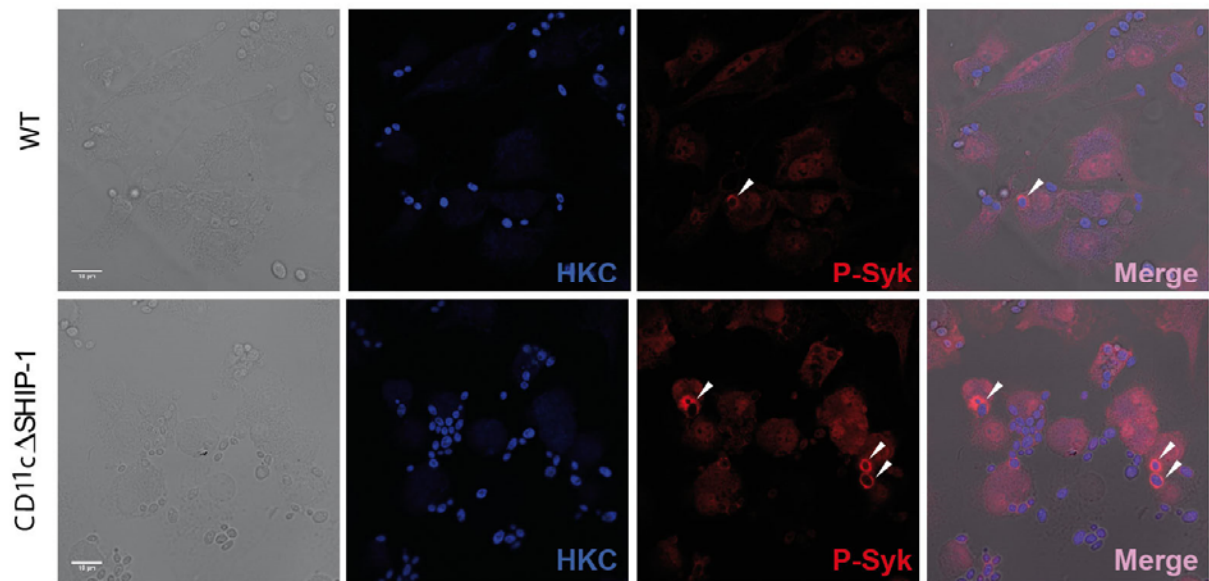
La imagen muestra GM-DCs diferenciadas de médula ósea procedente de ratones WT o CD11cΔSHIP-1 expuestas a HKC teñida con Cell Violet durante 3 minutos a 37°C, fijadas, permeabilizadas y teñidas con anti- SHIP-1. Las flechas blancas indican la relocalización de SHIP-1 endógeno alrededor de fagosomas que contenían HKC.

4.3.e) Análisis de la fosforilación de Syk mediada por Dectin-1 en ausencia de SHIP-1 en DCs.

La fosforilación de Syk tras el reconocimiento de un ligando específico de Dectin-1 es un paso crítico para los siguientes eventos de señalización a través de este CLR (Plato et al., 2013). Puesto que además, se ha propuesto una correlación entre una mayor expresión de SHIP-1 y una regulación negativa de la fosforilación de la quinasa Syk (Mertsching et al., 2008; Roes et al., 2003), decidimos estudiar el estatus de activación de Syk tras la estimulación de Dectin-1 en ausencia de SHIP-1. Para ello, GM-DCs fueron expuestas a HKC marcada con la sonda Cell Violet y se analizó la fosforilación de Syk mediante microscopía confocal.

Como esperábamos, P-Syk se relocalizó alrededor de fagosomas que contenían HKC (Figura R10.A). La intensidad de la tinción de P-Syk alrededor de la partícula de HKC se determinó por cuantificación mediante análisis de imagen de la intensidad media de fluorescencia en la región próxima a la partícula de HKC (Figura R10.B). La intensidad de fosforilación de Syk era mayor en GM-DCs CD11cΔSHIP-1 que en las GM-DCs WT, indicando que la activación de P-Syk está potenciada en células que pierden el SHIP-1.

A



B

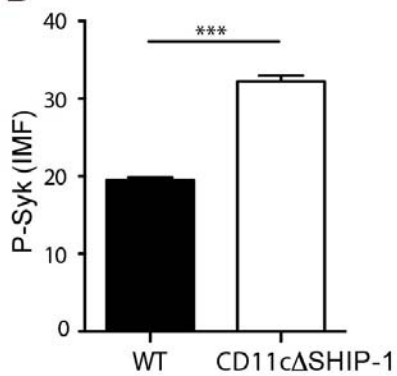


Figura R10. Análisis por inmunofluorescencia de la fosforilación de Syk en GM-DCs expuestas a HKC.

A) GM-DCs de ratones WT o CD11cΔSHIP-1 expuestas a HKC teñida con Cell Violet 15 minutos a 37°C, fijadas, permeabilizadas y teñidas con anti-P-Syk. Las flechas blancas indican la relocalización de P-Syk alrededor de fagosomas conteniendo HKC. **B)** La intensidad media de fluorescencia (IMF) de P-Syk alrededor de HKC fue cuantificada en más de 1500 eventos y aparece representada como la media aritmética +SEM.

Un paso más para caracterizar este mayor grado de fosforilación, fue el análisis y cuantificación de P-Syk por citometría de flujo. Como se puede observar en la Figura R11 y en consonancia con los resultados previamente expuestos, GM-DCs expuestas a HKC mostraron una mayor fosforilación de Syk en ausencia de SHIP-1.

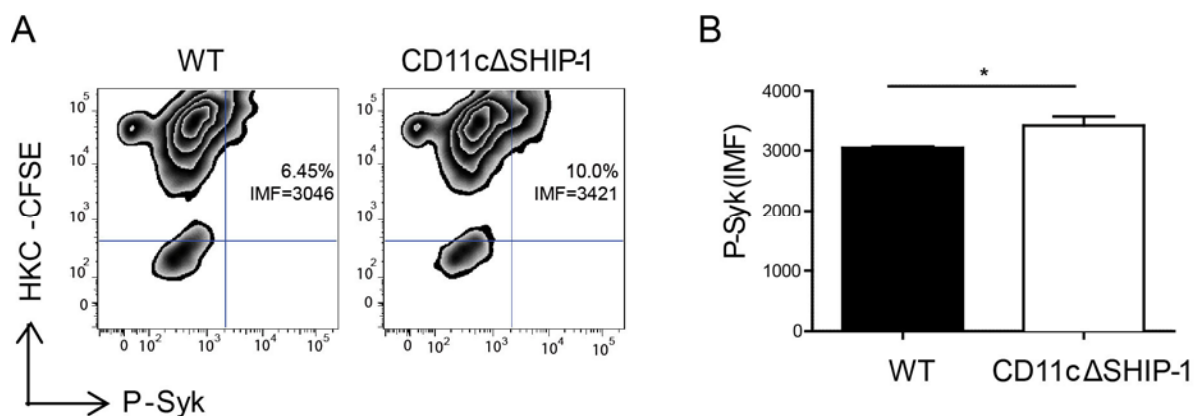


Figura R11. Análisis por citometría de flujo de fosforilación de Syk mediada por Dectin-1 en GM-DCs.

GM-DCs de ratones WT o CD11cΔSHIP-1 fueron expuestas a HKC teñida con CFSE a 37°C 30 minutos y analizadas por citometría de flujo. **A)** Gráfica de intensidad representativa donde están representados los eventos P-Syk positivos y la correspondiente intensidad de fluorescencia (IMF). **B)** Representación de la cuantificación de intensidad media de fluorescencia (IMF) de la media de eventos positivos de P-Syk de cuatro experimentos.

El estatus de activación de Syk fue también estudiado por *western blot* a distintos tiempos de estimulación (Figura R12.A) y densitometrado (Figura R12.B). Una vez más, las GM-DCs procedentes de ratones CD11cΔSHIP-1 mostraron una fosforilación mayor de Syk.

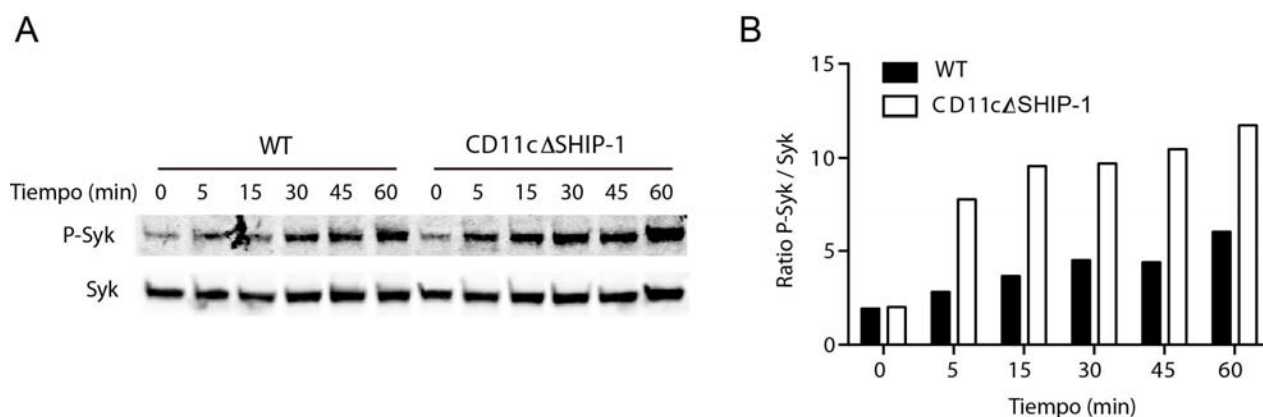


Figura R12. Análisis por WB de fosforilación de Syk mediada por Dectin-1 en CD11cΔSHIP-1.

GM-DCs de ratones WT o CD11cΔSHIP-1 fueron expuestas a HKC durante los tiempos indicados y P-Syk fue analizado por *western-blot*. **A)** *Western blot* representativo. **B)** Representación del densitometrado de P-Syk correspondiente al WB del panel A.

Todas estas evidencias indican que SHIP-1 regula negativamente la fosforilación de Syk tras la activación de Dectin-1.

4.3.f) Análisis de la activación de MAPKs, de los factores de transcripción NF- κ B y NFAT y de la producción de citoquinas en respuesta a *C. albicans* en DCs deficientes en SHIP-1.

Entre las respuestas mediadas por Syk tras la activación de Dectin-1, la activación de MAPKs, NF- κ B y NFAT son críticas para la producción de citoquinas (Sancho and Reis e Sousa, 2012). Puesto que GM-DCs de ratones CD11 Δ cSHIP-1 mostraron una mayor fosforilación de Syk tras la estimulación con HKC, decidimos analizar estas rutas de señalización. La fosforilación de las MAPK, ERK y p38, y la degradación de I κ B α fueron analizadas como elementos representativos en la ruta de activación de MAPK o NF- κ B respectivamente (Figura R13). En todos los casos, no observamos diferencias entre GM-DCs WT y CD11 Δ cSHIP-1 en respuesta a HKC.

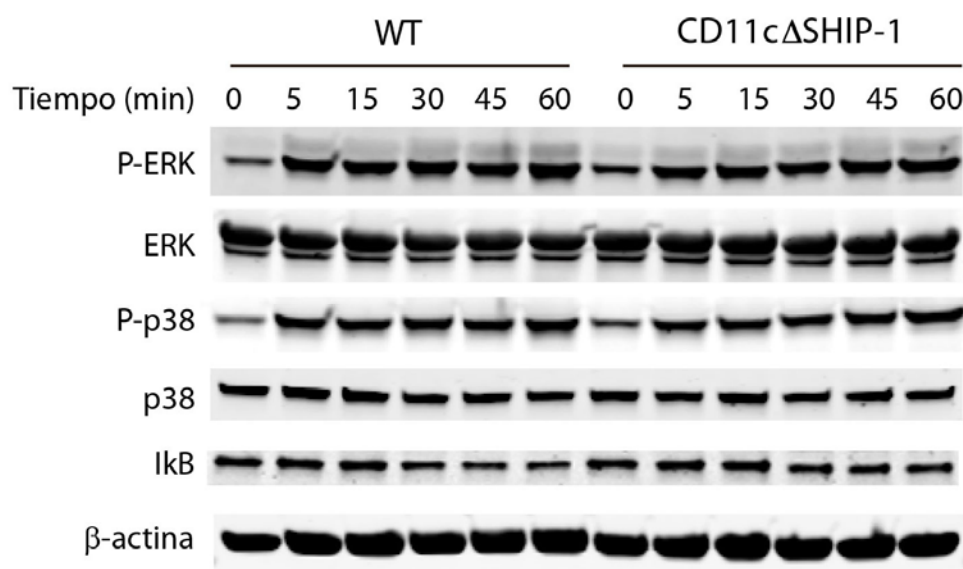


Figura R13. Activación de MAPK y NF- κ B mediada por Dectin-1 en DCs deficientes en SHIP-1.

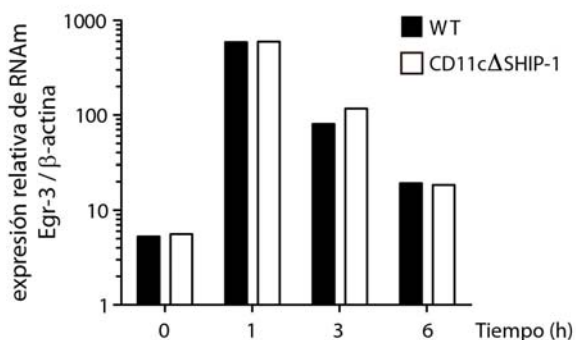
BMDCs purificadas desde ratones WT o CD11 Δ cSHIP-1 fueron tratadas con HKC a los tiempos indicados. La activación de las quinasas ERK y p38 fue comprobada en WB por la fosforilación de ambas respecto a sus controles no fosforilados. La activación de NF- κ B se comprobó mediante la degradación de I κ B, empleando la β -actina como control de carga.

Los factores de transcripción de respuesta a crecimiento temprano (Egr, del inglés *Early growth response*) son una familia de genes diana de NFAT inducidos en respuesta a Dectin-1, de manera que su expresión correlaciona con la actividad transcripcional NFAT (Goodridge et al., 2007). Egr-3 fue igualmente expresado en

respuesta a HKC en GM-DCs de ratones CD11c Δ SHIP-1 y WT (Figura R14), indicando que la activación de NFAT no está afectada en ausencia de SHIP-1.

Figura R14. Activación de NFAT mediada por Dectin-1 en DCs deficientes en SHIP-1.

GM-DCs procedentes de ratones WT o CD11c Δ SHIP-1 fueron tratadas con HKC a los tiempos indicados. La activación de las NFAT fue medida mediante la expresión del mRNA de Egr-3 por PCR cuantitativa.



Consistente con un papel redundante para SHIP-1 en la activación de MAPKs y NF- κ B, no observamos diferencias en la producción de TNF α , IL6, IL12p40, IL10 e IL2 en respuesta a HKC cuando comparamos GM-DCs procedentes de ratones CD11c Δ SHIP-1 y WT (Figura R15).

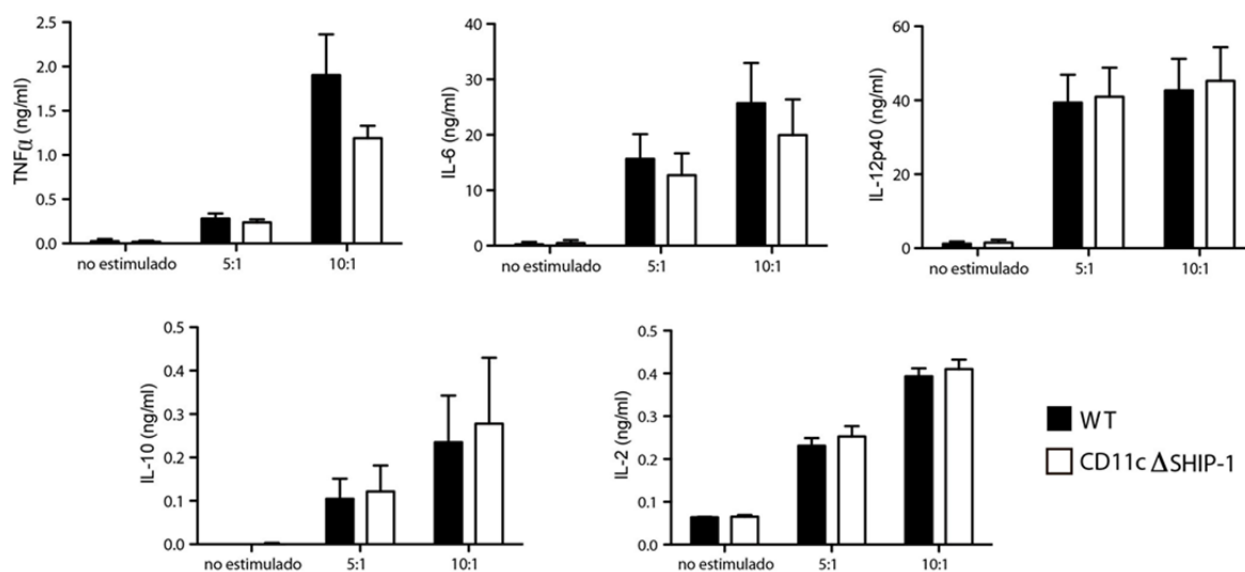


Figura R15. Producción de citoquinas en GM-DCs en respuesta a HKC.

GM-DCs derivadas de ratones WT o CD11c Δ SHIP-1 fueron tratadas 24h con HKC a los ratios 5:1 y 10:1. El sobrenadante fue recogido y las citoquinas producidas fueron cuantificadas por ELISA. Las barras representan la media aritmética + SEM de tres a cinco experimentos independientes.

La producción de IL-1 β por GM-DCs fue también analizada tanto a nivel transcripcional (Figura R16.A) en respuesta a HKC, como a nivel proteico en respuesta a *C. albicans* viva (Figura R16.B), ya que es necesaria levadura viva

para la activación del inflamasoma y consecuente producción de IL-1 β (Gross et al., 2009). En ambos casos, no se detectaron diferencias entre GM-DCs CD11c Δ SHIP-1 y WT.

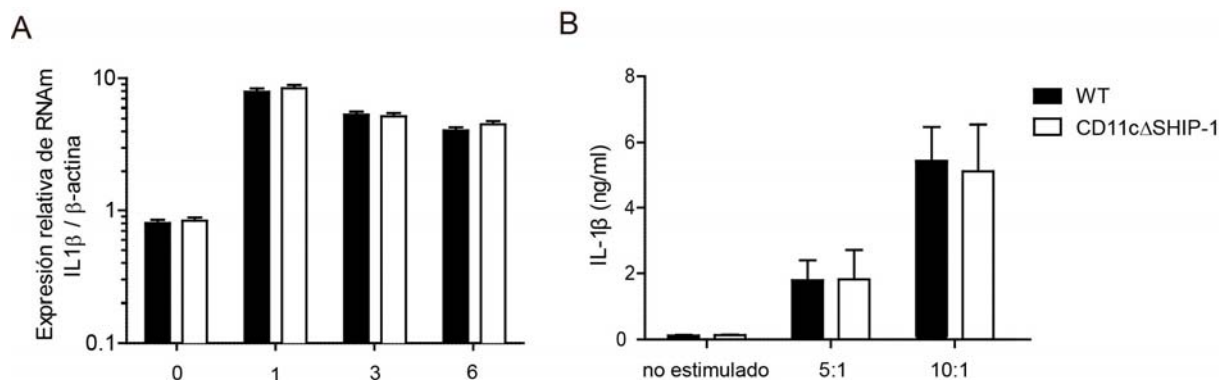


Figura R16. Producción de IL-1 β en GM-DCs en respuesta a HKC o *C. albicans* viva.

A) GMDCs derivadas de ratones WT o CD11c Δ SHIP-1 se trataron con HKC durante los tiempos indicados y la expresión del RNA mensajero para IL1 β fue medida por PCR cuantitativa. **B)** GM-DCs derivadas de ratones WT o CD11c Δ SHIP-1 se estimularon durante 4h con *C. albicans* viva al ratio 10:1. Las citoquinas producidas se cuantificaron en el sobrenadante de los cultivos mediante ELISA. Las barras representan la media aritmética + SEM de tres a cinco experimentos independientes.

El conjunto de estos datos indica que a pesar de la mayor fosforilación de Syk en respuesta a Dectin-1 en GM-DCs deficientes en SHIP-1, gran parte de las rutas de señalización posteriores y el patrón de expresión de citoquinas no se afectan.

4.3.g) Análisis de los niveles de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidos vía Dectin-1-Syk en ausencia de SHIP-1 en DCs.

La producción de ROS es otro importante evento activado por Dectin-1 de manera dependiente de Syk (Plato et al., 2013). Se analizó la generación de ROS en GM-DCs derivadas de ratones CD11c Δ SHIP-1 y WT en respuesta a HKC. Observamos una producción de ROS mayor en ausencia de SHIP-1 (Figura R17.A). Esta producción de ROS exacerbada es independiente del ratio HKC:DC utilizado (Anexo 7).

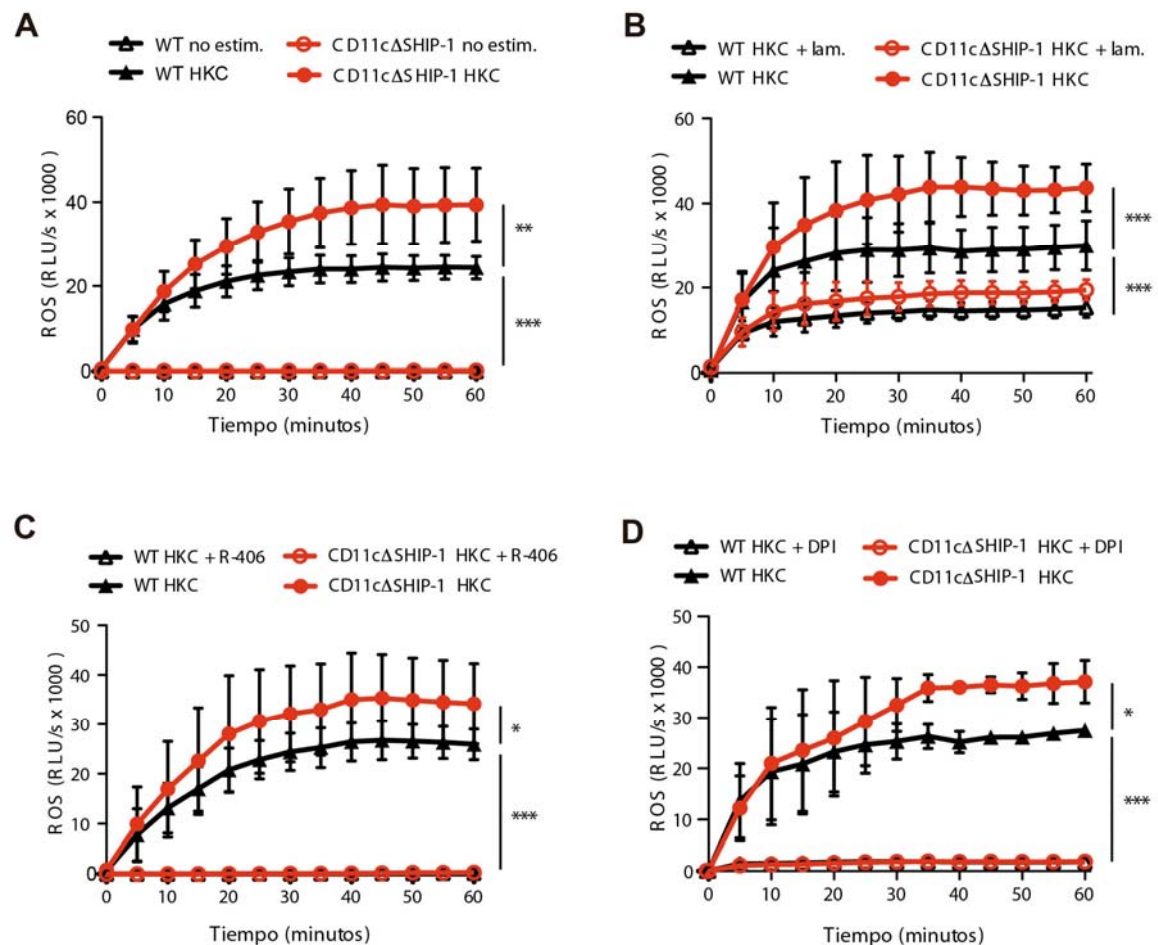


Figura R17. Producción de ROS mediada por Dectin-1/Syk en GM-DCs deficientes en SHIP-1.

(A-D) GM-DCs derivadas de ratones WT y CD11cΔSHIP-1 fueron estimuladas o no (no estim.) con HKC y la producción de ROS fue monitorizada mediante quimioluminiscencia durante los tiempos indicados y expresada en RLU/s. En otros experimentos, las GM-DCs se trataron con 200 μ g/ml de laminarina (B), 3 μ M de R406 (C), o 5 μ M de DPI (D) de manera previa a la exposición a HKC. Las barras muestran la media aritmética \pm SEM correspondiente a entre tres y seis experimentos.

Para comprobar la dependencia de Dectin-1 en este proceso, se trataron las GM-DCs con laminarina de manera previa a la exposición a HKC (Figura R17.B). La producción de ROS en estas células se redujo de manera considerable y se eliminaron las diferencias entre las GM-DCs derivadas de CD11cΔSHIP-1 y WT, indicando que la mayor producción de ROS en respuesta a HKC en GM-DCs deficientes en SHIP-1 es mediada por Dectin-1.

Aplicando esta misma aproximación, también confirmamos que esta mayor producción de ROS en GM-DCs derivadas de ratones CD11cΔSHIP-1 tras el reconocimiento de HKC es dependiente de Syk, ya que el pretratamiento de estas

DCs con R-406, un inhibidor específico de Syk, inhibe completamente la generación de ROS (Figura R17.C).

Puesto que se ha descrito que la producción de ROS vía Dectin-1 es mediada por la activación de la NADPH oxidasa (Gantner et al., 2003) comprobamos si esta enzima estaba implicada en la mayor producción de ROS en DCs deficientes en SHIP-1. El tratamiento previo con DPI, el inhibidor de NADPH oxidasa, abolió completamente la producción de ROS, tanto en GM-DCs derivadas de ratones CD11c Δ SHIP-1 como en WT (Figura R17.D).

Para evaluar si la estimulación con HKC era capaz de activar directamente el complejo NADPH oxidasa e intentar correlacionar esta activación con la mayor producción de ROS mediada vía Dectin-1/Syk en GM-DCs deficientes en SHIP-1, medimos la fosforilación de la subunidad citosólica p40 de la NADPH oxidasa. La activación de esta subunidad se ha en respuesta a ligandos de Dectin-1 (Ma et al., 2014). El análisis por *western blot* de la fosforilación de p40-phox mostró un incremento en su activación en ausencia de SHIP-1 en respuesta a HKC (Figura R18).

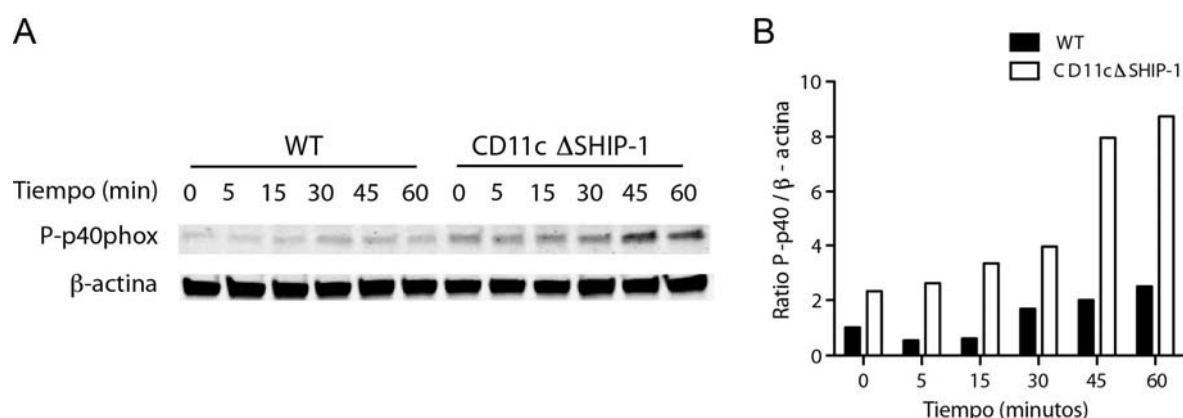


Figura R18. Análisis de activación de la NADPH oxidasa mediada por Dectin-1/Syk en DCs deficientes en SHIP-1.

GM-DCs derivadas de ratones WT y CD11c Δ SHIP-1 fueron estimuladas con HKC a los tiempos indicados y la fosforilación de la subunidad p-40-phox de NADPH oxidasa fue detectada por WB (**A**). La gráfica (**B**) muestra el análisis de densitometrado de la figura A normalizado en función de la proteína total empleando β -actina como control de carga.

Estos resultados indican que SHIP-1 regula la producción de ROS en respuesta a Dectin-1 de manera dependiente de Syk y NADPH oxidasa.

4.3.h) Estudio de la implicación de SHIP-1 en la actividad candidicida de las DCs.

La generación de ROS mediada por NADPH oxidasa en células del sistema inmune es uno de los mecanismos más eficientes de eliminación de patógenos invasores (Dupré-Crochet et al., 2013) y ha sido descrito como relevante contra *C. albicans* (Donini et al., 2007). Esto nos llevó al estudio de la actividad candidicida de GM-DCs derivadas de ratones CD11c Δ SHIP-1 mediante el cultivo de estas células junto con la levadura durante 4 horas (Figura R19).

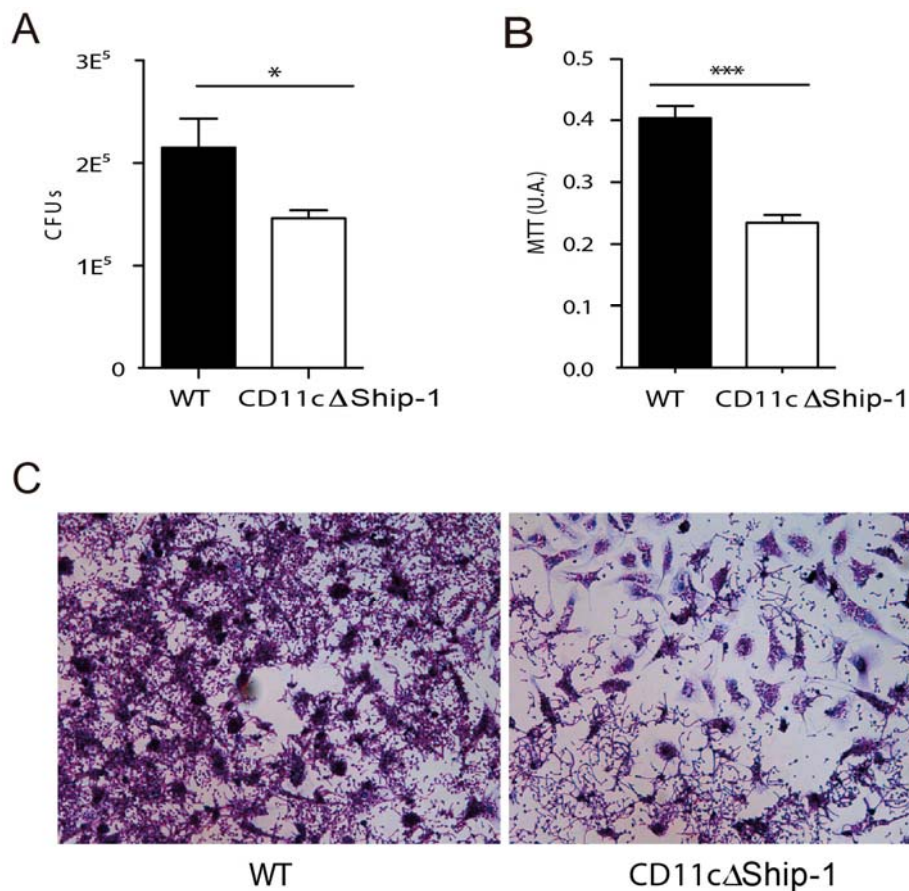


Figura R19. Estudio de la capacidad candidicida de GM-DCs deficientes en SHIP-1.

GM-DC derivadas de ratones WT y ratones CD11c Δ SHIP-1 fueron incubadas con *C. albicans* durante 4 horas tras las cuales se comprobó la capacidad candidicida de las DCs mediante diferentes aproximaciones. **A)** *C. albicans* se extrajo tras la incubación y se cuantificó mediante unidades formadoras de colonias (CFUs). **B)** *C. albicans* presente en el cultivo tras la incubación fue cuantificada mediante un ensayo MTT y expresada en unidades de absorbancia (U.A). **(A-B)** Las barras representan la media + SEM de tres experimentos independientes. **C)** El crecimiento de *C. albicans* fue observado al microscopio tras la tinción PAS/hematoxilina de las hifas.

Tras esta incubación, cuantificamos la supervivencia de *C. albicans* mediante el análisis de unidades formadoras de colonias o CFUs (Figura R19.A), un ensayo denominado MTT (Levitz and Diamond, 1985) (Figura R19.B) o visualización de las hifas por microscopía (Figura R19.C). El ensayo MTT consiste en una reacción bioquímica de un compuesto denominado bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) con las deshidrogenasas fúngicas. A mayor absorbancia, mayor cantidad de hifas y menor actividad candidicida. Observamos una mejor eliminación de *C. albicans* en presencia de DCs deficientes en SHIP-1

Para abordar la cuestión de si la mayor actividad candidicida observada en GM-DCs CD11cΔSHIP-1 se explica por una mayor producción de ROS mediada por Dectin-1 y Syk se utilizó la siguiente estrategia: GM-DCs derivadas de ratones CD11cΔSHIP-1 y WT se trataron previamente con laminarina (Figura R20.A), R-406, (Figura R20.B) o DPI (Figura R 20.C) y se analizó la actividad candidicida empleando el ensayo MTT.

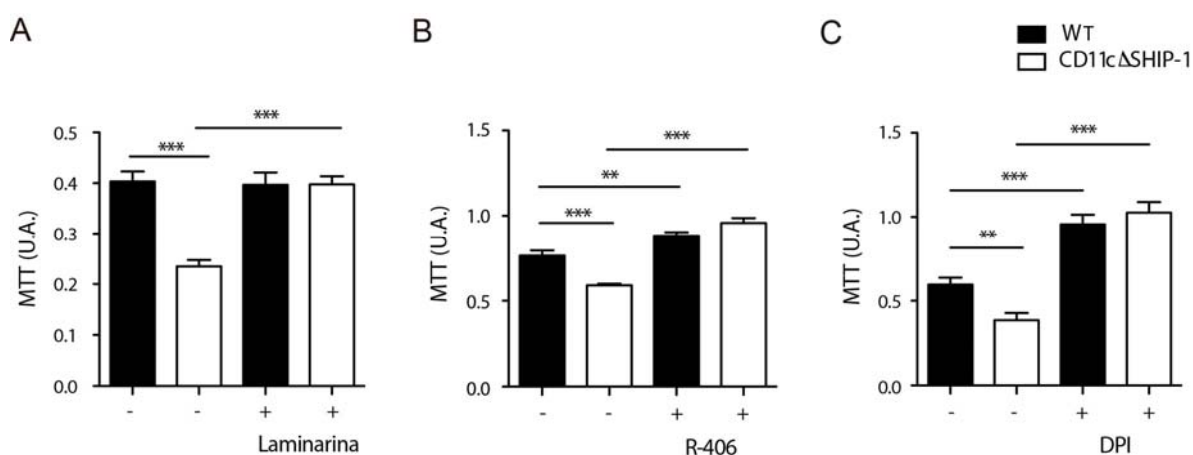


Figura R20. Estudio del papel de Dectin-1/Syk/NADPH oxidasa en la capacidad candidicida de DCs deficientes en SHIP-1.

GM-DC derivadas de ratones WT y CD11cΔSHIP-1 fueron incubadas con *C. albicans* durante 4 horas en ausencia o presencia de 200 µg/ml de laminarina (A), 3 µM de R406 (B), o 5 µM de DPI (C). La capacidad candidicida de las DCs fue cuantificada mediante un ensayo MTT y representada en unidades de absorbancia (U.A.). Los histogramas representan la media aritmética + SEM de tres experimentos independientes.

En todos los casos las GM-DCs deficientes en SHIP-1 fueron más eficientes en la eliminación de *C. albicans* que GM-DCs WT sin tratar previamente con ningún inhibidor. Por otra parte, la inhibición de Syk y NADPH oxidasa redujo la capacidad candidicida de las DCs WT, permitiendo un mayor crecimiento de la levadura y sugiriendo que la generación de ROS a través del eje Dectin-1/Syk/NADPH oxidasa es esencial en la defensa contra *C. albicans*. Es importante destacar que el uso de cada uno de esos inhibidores suprimió la mayor capacidad candidicida de las DCs deficientes en SHIP-1, indicando que SHIP-1 regula la ruta mediada por NADPH oxidasa, Syk y Dectin-1 implicada en la eliminación de *C. albicans*.

4.4- Implicación de SHIP-1 en la infección in vivo por *C. albicans*.

Como se ha mencionado anteriormente la generación de ROS producida por células del sistema inmune es uno de los mecanismos más eficientes en la eliminación de patógenos invasores como *C. albicans*. Puesto que esta producción de ROS es mayor *in vitro* en las DCs deficientes en SHIP-1 expuestas a *C. albicans*, y esto parece ser la causa de su mayor capacidad candidicida, el siguiente paso fue estudiar si este efecto podía ser relevante en modelos de infección *in vivo*.

4.4.a) Modelo de candidiasis sistémica.

La posible implicación de SHIP-1 en DCs en la respuesta frente a la infección por *C. albicans* se estudió en un modelo de candidiasis sistémica (Spellberg et al., 2005) donde el riñón es el principal órgano afectado (Lionakis et al., 2011; Spellberg et al., 2005). Para ello, ratones CD11c Δ SHIP-1 se inyectaron por vía intravenosa con *C. albicans* a una dosis de 1×10^5 CFU/ratón. Tras 24 o 72h se extrajo el riñón izquierdo, para determinar la carga fúngica mediante el cálculo de CFUs (figura R21.A). Como se observa, la ausencia de SHIP-1 en DCs no afectó la colonización del riñón tras la infección (Figura R21.B-C).

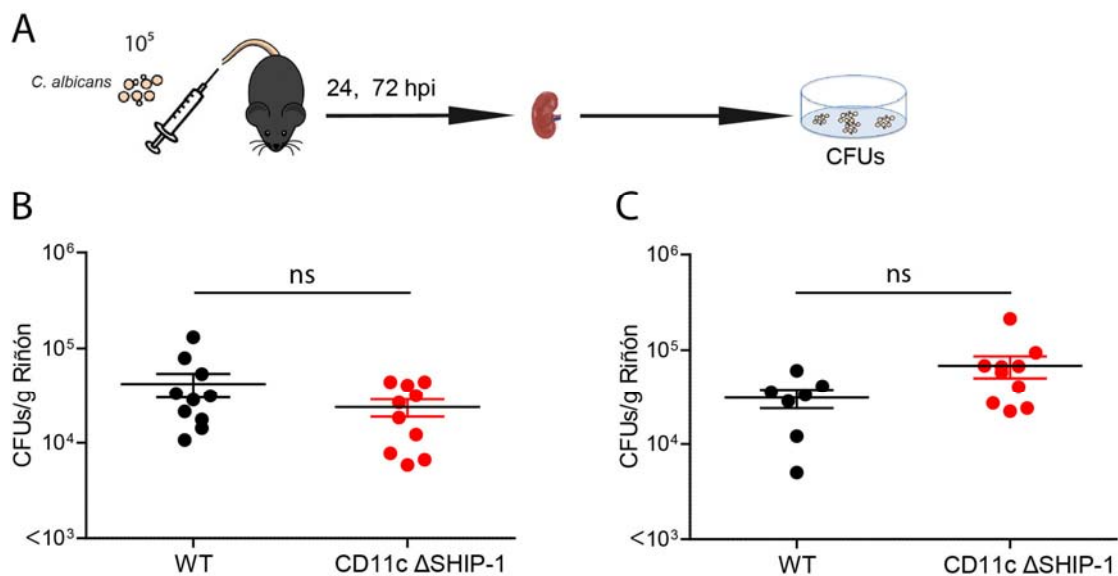


Figura R21. Modelo *in vivo* de candidiasis sistémica en ratones CD11c Δ SHIP-1.

A) Ratones CD11c Δ SHIP-1 y ratones WT fueron inyectados con 1×10^5 CFUs de *C. albicans* por vía intravenosa y 24 o 72 horas post infección (hpi) se extrajo el riñón y se sembró en placas de agar YPD para cuantificación de la carga fúngica mediante CFUs. **B)** CFUs/g de riñón a 24 hpi. **C)** CFUs/g de riñón a 72 hpi.

4.4.b) Modelo de infección intraperitoneal con *C. albicans*.

Otro de los modelos que analizamos fue el modelo de infección intraperitoneal con *C. albicans* que ha sido previamente descrito como dependiente de Dectin-1 (Taylor et al., 2007). Los ratones CD11c Δ SHIP-1 fueron inyectados en el peritoneo con *C. albicans* a una dosis de 1×10^5 CFUs/ratón y tras 4h se recolectó el infiltrado inflamatorio para su análisis mediante citometría de flujo (Figura R22.A).

Como se puede ver en la Figura R22, tras el análisis de las poblaciones inflamatorias celulares pudimos constatar que la ausencia de SHIP-1 en DCs no afectaba la respuesta inflamatoria producida. Tanto el número de DCs (Figura R22.B) y neutrófilos (Figura R22.C), como la reducción de macrófagos residentes (Figura R22.D) no variaron entre ratones CD11c Δ SHIP-1 y ratones WT.

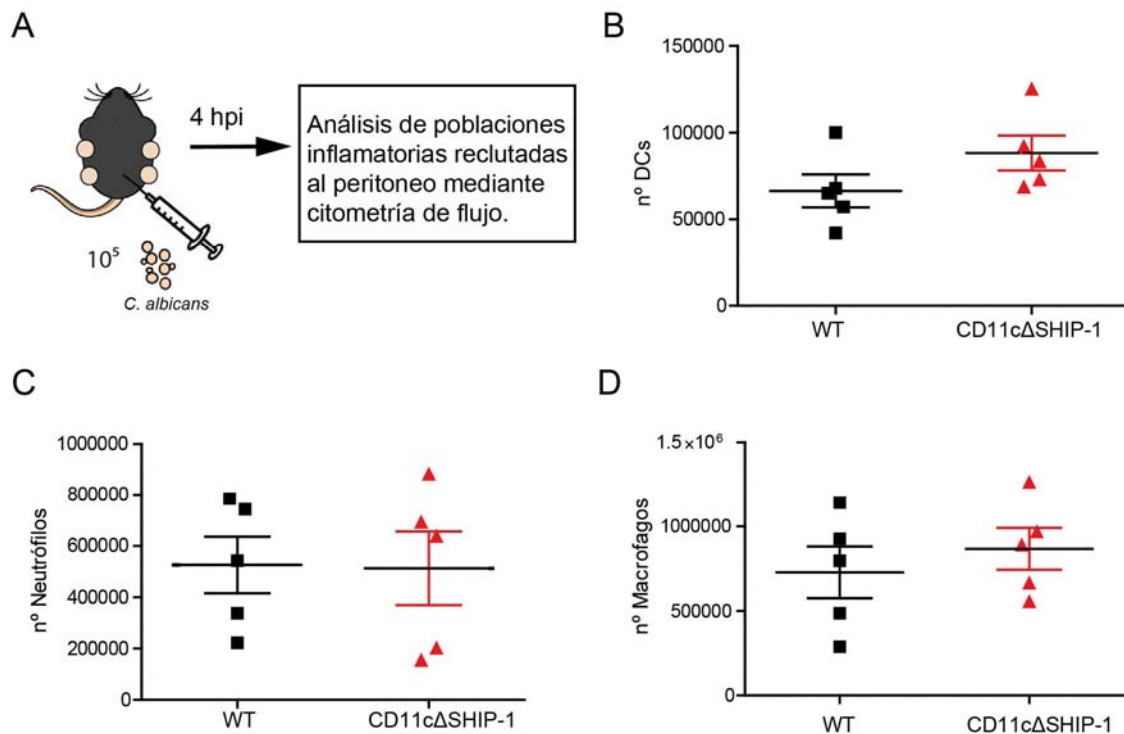


Figura R22. Modelo de infección intraperitoneal con *C. albicans* y estudio de respuesta inflamatoria en ratones CD11cΔSHIP-1.

A) Ratones CD11cΔSHIP-1 y ratones WT fueron inyectados con 1×10^5 CFUs de *C. albicans* en el peritoneo y 4 horas post infección (hpi) se analizaron mediante citometría de flujo las poblaciones inflamatorias reclutadas al peritoneo. **B)** Número de DCs en el peritoneo **C)** Neutrófilos reclutados al peritoneo. **D)** Desaparición de macrófagos residentes.

4.4.c) Modelo de inflamación intraperitoneal con Curdlan

Para estudiar el papel de SHIP-1 en la señalización vía Dectin-1 y su posible papel en regular la respuesta inflamatoria, decidimos extender la depleción de SHIP-1 a línea germinal y tratar de testar el efecto funcional en modelos dependientes de Dectin-1 para lograr la especificidad. Puesto que en los ensayos anteriores la depleción de SHIP-1 en DCs fue insuficiente para detectar un efecto in vivo y el fenotipo de los ratones SHIP-1^{-/-} es demasiado profundo, realizamos el análisis de este modelo en ratones heterocigotos para SHIP-1 (SHIP-1^{+/-}). Los ratones heterocigotos para SHIP-1 mostraron un fenotipo parcialmente similar a ratones WT en homeostasis, puesto que generalmente no presentan el síndrome mieloproliferativo característico de ratones SHIP-1^{-/-} (Helgason et al., 1998). Ratones WT o heterocigotos para SHIP-1 fueron inyectados por vía intraperitoneal con 250 µg de Curdlan, un β-1,3-glucano obtenido de *Alcaligenes faecalis* que se

considera ligando específico de Dectin-1 y que provoca una inflamación peritoneal dependiente de Dectin-1 (Rosas et al., 2008). Tras 4h se recolectó el infiltrado inflamatorio para su análisis el análisis de poblaciones mediante citometría de flujo (Figura R23.A).

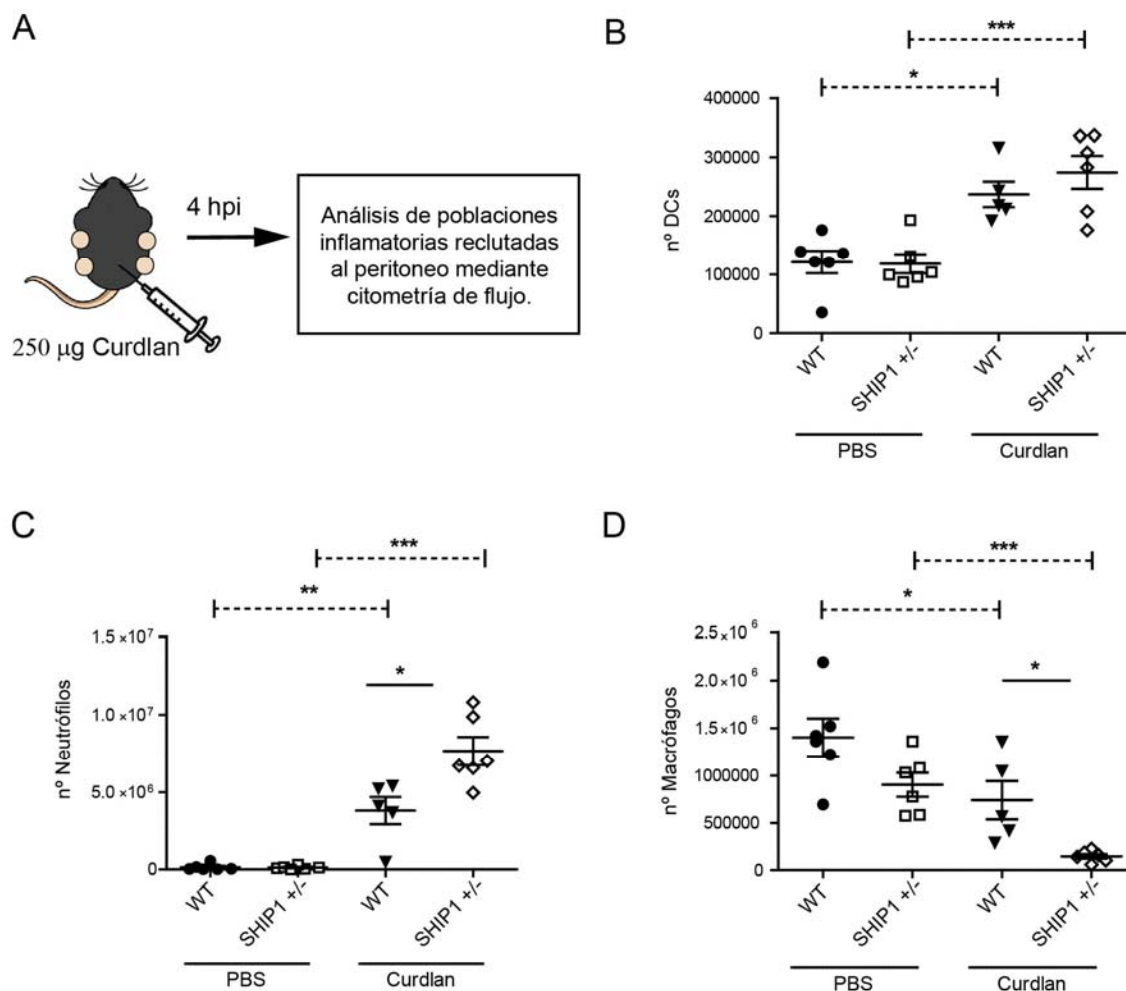


Figura R23. Modelo de inflamación intraperitoneal con Curdlan en ratones heterocigotos para SHIP-1 (SHIP-1^{+/-}).

A) Ratones heterocigotos para SHIP-1 y WT fueron inyectados con 1×10^5 partículas de Curdlan por vía intraperitoneal y 4 horas post infección (hpi) se analizaron mediante citometría de flujo las poblaciones inflamatorias reclutadas al peritoneo. **B)** Número de DCs presentes en el peritoneo. **C)** Neutrófilos reclutados al peritoneo. **D)** Reducción de macrófagos residentes.

A pesar de que el número de DCs presentes en el peritoneo tras la inyección de Curdlan es similar en ambos (figura R23.B), el reclutamiento de neutrófilos es mayor en ratones heterocigotos para SHIP-1^{+/-} que en ratones WT (Figura R23.C). También es mayor la desaparición de macrófagos residentes en el peritoneo tras la inflamación generada (Figura R23.D). Las diferencias observadas en este modelo

de inflamación sugieren que la reducción de los niveles de SHIP-1 en ratones heterocigotos podría modular la señalización vía Dectin-1 y la respuesta inflamatoria tras la exposición a β -glucanos en otros tipos celulares como macrófagos o neutrófilos que también expresan Dectin-1.

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

Desde su primera caracterización en una librería de cDNA (Ariizumi et al., 2000), Dectin-1 ha sido uno de los CLRs más estudiados. Esto se debe no sólo a su influencia en la respuesta inflamatoria frente a patógenos fúngicos que exponen β -glucanos en su pared celular, sino también a sus particularidades estructurales (Brown, 2006; Drummond et al., 2011; Leibundgut-Landmann et al., 2007; Underhill et al., 2005). Dectin-1, junto con CLEC-2, DNGR-1 y SIGN-R3, posee un motivo hemITAM que se considera activador (Fuller et al., 2007; Huysamen et al., 2008; Sancho et al., 2009; Tanne et al., 2009). Tras el reconocimiento de β -glucanos, el dominio intracelular de Dectin-1 que contiene este hemITAM, desencadena una poderosa señalización tras su fosforilación en tirosina. El uso de péptidos biotinilados correspondientes a la región intracelular del receptor ha evidenciado que únicamente la fosforilación de la tirosina 15, proximal a la membrana, es requerida para la activación de esta señalización (Rogers et al., 2005). Esto fue corroborado más tarde mediante análisis funcionales (Mansour et al., 2013; Underhill et al., 2005). El estudio de CLEC-2 como modelo de receptor que contiene un motivo hemITAM permitió proponer un modelo en el que la dimerización de los CLRs proporciona una plataforma que contiene las dos tirosinas fosforiladas necesarias para la asociación y activación de Syk (Hughes et al., 2010).

Los CLRs que contienen motivos hemITAM promueven una amplia diversidad de respuestas funcionales. Por ejemplo, Dectin-1 está implicado en la generación de ROS en fagosomas de macrófagos de manera dependiente de Syk, con un papel microbicida directo en el fagosoma (Underhill et al., 2005). SIGN-R3 puede modular señales por otros CLRs (Lefèvre et al., 2013) y DNGR-1 está involucrado en retención de carga necrótica en un compartimento pre-lisosomal (Iborra et al., 2012; Zelenay et al., 2012). A pesar de la diversidad de respuestas funcionales, la asociación de Syk a los hemITAMs de cada uno de estos receptores es similar, sugiriendo que podría haber una asociación diferencial con proteínas de señalización adicionales en sus respectivas colas intracelulares. Dectin-1 humano también puede inducir una segunda vía de señalización mediada por la serina-treonina quinasa Raf-1 de forma independiente a Syk, aunque converge con la vía

canónica acoplada a Syk a nivel de NF- κ B (Gringhuis et al., 2009). Sin embargo, aparte de Syk y Raf1 (Gringhuis et al., 2009; Rogers et al., 2005), los efectores que se acoplan a la señalización temprana de los receptores con hemITAM no se ha caracterizado.

Por ello, decidimos explorar mediante proteómica el espectro de proteínas que se unen a la cola intracelular de Dectin-1 en células dendríticas. Para ello, se emplearon péptidos biotinilados correspondientes al dominio intracelular de Dectin-1 fosforilado o no en tirosina (Rogers et al., 2005) que se utilizaron para inmunoprecipitar lisados de células dendríticas y detectar por proteómica las proteínas de dichos lisados que se asociaban a la cadena citoplasmática de Dectin-1. El uso de este abordaje nos permitió identificar varias quinasas incluyendo Syk o quinasas de la familia Src, como Hck o Lyn, que se asociaban a la cadena de Dectin-1 fosforilada en tirosina y que han sido implicadas previamente en la señalización vía Dectin-1 (Huysamen et al., 2008) (Elsori et al., 2011; Rogers et al., 2005), validando nuestra metodología experimental. Sin embargo, también identificamos fosfatasas asociadas únicamente al hemITAM fosforilado como SHIP-1, SHP-1 y SHP-2. Puesto que tanto estas quinasas como fosfatasas que interaccionan de manera específica con el péptido fosforilado del dominio citoplasmático de Dectin-1. Estos resultados sugieren que estos efectores tempranos podrían estar interactuando con el dominio intracelular de Dectin-1 tras su activación en la célula dendrítica. Se ha descrito la asociación de SHIP-1 al complejo de señalización asociado a CLEC-2 (Parguñña et al., 2012), sugiriendo que la asociación de fosfatasas inhibitorias podría ser común para CLRs de esta familia. Esta regulación positiva por quinasas y negativa a través de fosfatasas podría contribuir a explicar la variación en respuestas funcionales asociadas a receptores que contienen el dominio hemITAM.

Debido a que la fosfatasa SHIP-1 presentó el número más alto de péptidos únicos en el recuento de proteínas unidas a Dectin-1 fosforilado, decidimos centrarnos en su estudio. Esta fosfatasa es una inositol fosfatasa 5' que estructuralmente contiene un dominio SH2 en la región N-terminal, una región central donde presenta el dominio fosfatasa catalítico y una fracción C- terminal que contiene regiones ricas en prolina con dos dominios de unión a fosfo-tirosina (PTB) y dos motivos de interacción con proteínas que contienen SH3 (Fernandes et

al., 2013). La región C-terminal también ha sido implicada en interacciones proteína-proteína tras la fosforilación (Dong et al., 2006; Lamkin et al., 1997), pero mayoritariamente en la localización de SHIP-1 en la membrana (Phee et al., 2000). Esta localización parece necesaria para su papel inhibidor mediado por FcγRIIB en la vía desencadenada por el receptor de la célula B (Aman et al., 2000) o en la modulación de la degranulación de mastocitos (Damen et al., 2001). Por otra parte, el dominio SH2 localizado en la región N-terminal de SHIP-1 media interacciones con proteínas fosforiladas en tirosina tales como moléculas de señalización (Robson et al., 2004) y receptores que contienen ITAMs (Mukherjee et al., 2012; Osborne et al., 1996) e ITIMs (Ono et al., 1997). Nuestros datos muestran una interacción entre la proteína recombinante tSHIP-1 y el dominio intracelular de Dectin-1 fosforilado en la tirosina 15 del hemITAM. Este residuo es crítico para que se produzca esta interacción, en consonancia a lo descrito para la unión de Syk (Rogers et al., 2005; Underhill et al., 2005). Esta interacción podría ser mediada por el dominio SH2 de la región N-terminal, puesto que el tSHIP-1 está truncado en la región rica en prolina del extremo C-terminal. Nuestros datos muestran colocalización de SHIP-1 y Dectin-1 alrededor de fagosomas que contienen zymosan en células CHO-K1, sugiriendo que la fosfatasa SHIP-1 interactúa con Dectin-1 en la sinapsis fagocítica. Por otra parte, al igual que ocurre con Syk, la fosforilación en la tirosina 15 del hemITAM de Dectin-1 es necesaria para la interacción con SHIP-1, haciendo de este residuo una diana crítica para mecanismos reguladores positivos o negativos.

Para determinar la relevancia de la delección de SHIP-1 en respuesta a Dectin-1 en células dendríticas, se generaron ratones deficientes en SHIP-1 en el compartimento CD11c mediante el cruce de ratones SHIP-1^{flox/flox} (Wang et al., 2002a) y transgénicos CD11c (Caton et al., 2007). El análisis de las distintas poblaciones de células mieloides en el ratón CD11cΔSHIP-1 generado es relevante, ya que se ha descrito previamente que en el medio inflamatorio generado en la línea germinal de ratones SHIP-1^{-/-} existen efectos extrínsecos sobre la función de células inmunes y células madre hematopoyéticas (Collazo et al., 2012; Ghansah et al., 2004; Hazen et al., 2009). Además estos ratones muestran las poblaciones mieloides afectadas en número y fenotípicamente. Por otra parte existe cierta controversia sobre la afectación de la presentación

antigénica de DCs procedentes de estos ratones. Mientras que unos grupos lo atribuyen a un efecto intrínseco de la delección de SHIP-1 en las células dendríticas que afecta tanto al número y maduración de estas células, como a su capacidad de presentación a células T (Antignano et al., 2010a; Neill et al., 2007). Sin embargo, el grupo de W. Kerr lo atribuye a efectos extrínsecos de otros tipos celulares, en concreto al incrementado número de células mieloides supresoras, puesto que al purificar DCs de tejidos linfoides secundarios de estos ratones no ven afectación de la capacidad presentadora de estas DCs deficientes en SHIP-1 (Ghansah et al., 2004). En ratones CD11c Δ SHIP-1. Nuestro análisis muestra que distintas poblaciones de células mieloides como neutrófilos, linfocitos, o células dendríticas en ratones CD11c Δ SHIP-1 en estado basal no presentan diferencias en comparación con ratones WT. Puesto que SHIP-1 está delecionado únicamente en el compartimento CD11c en los ratones CD11c Δ SHIP-1, no se observan a nivel macroscópico los efectos de la delección completa de SHIP-1 en otros tipos celulares (Ghansah et al., 2004).

Asimismo, se diferenciaron DCs *in vitro* a partir de médula ósea de ratones WT y CD11c Δ SHIP-1 con GM-CSF (GM-DCs). Estas GM-DCs reproducen algunas características de células dendríticas inflamatorias. GM-DCs diferenciadas *in vitro* de estos ratones CD11c Δ SHIP-1 no presentan alteraciones significativas en comparación a sus homólogos WT, en términos de número de células generadas o marcadores de maduración y activación a pesar de la deficiencia de SHIP-1. Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos por Krystal y colegas, donde GM-DC diferenciadas *in vitro* a partir de ratones SHIP-1^{-/-} mostraron una expansión incrementada junto con un fenotipo inmaduro (Antignano et al., 2010a). Esta aparente discrepancia podría ser explicada debido a la hiperreactividad a GM-CSF descrita para los precursores de médula ósea de ratones deficientes en SHIP-1, que de hecho es la causante del síndrome mieloproliferativo observado en estos ratones (Helgason et al., 1998; Liu et al., 1999). Este efecto podría ser diferente cuando la delección de SHIP-1 basada en la recombinasa Cre ocurre de manera intrínseca en las células maduras, una vez que la expresión de CD11c se ha estabilizado. Un ejemplo de esto es lo que ocurre en ratones SHIP-1^{-/-} (Helgason et al., 1998) con un reducido número de células T, mientras que la delección específica de SHIP-1 en células T CD4⁺ no produce este efecto (Tarasenko et al., 2007). Aun

así, nuestros datos irían en la línea de análisis realizados en el grupo de W. Kerr en los que atribuyen estas diferencias en las DCs SHIP-1^{-/-} al efecto de otros tipos celulares donde se da la delección de SHIP-1 (Ghansah et al., 2004), puesto que únicamente las DCs son deficientes en SHIP-1.

La expresión de Dectin-1 era similar en GM-DCs deficientes en SHIP-1 y WT, lo cual es esencial para el adecuado estudio del papel de SHIP-1 en la señalización vía este receptor. Tras la estimulación de GM-DCs SHIP-1 endógeno es reclutado al fagosoma que contiene HKC, sugiriendo un proceso de relocalización similar al observado previamente en células CHO-K1. Por lo tanto, estos datos nos sugieren un posible papel de SHIP-1 en respuestas mediadas por Dectin-1 en GM-DCs. La estimulación de GM-DCs WT y CD11cΔSHIP-1 con HKC, *C. albicans* viva o microesferas de látex nos indicó que SHIP-1 no tiene un papel en la fagocitosis. Por otra parte, el bloqueo del Dectin-1 con laminarina nos indicó que únicamente la fagocitosis de HKC es dependiente de Dectin-1. Esto puede explicarse debido a la presencia de otros receptores que estarían reconociendo otros PAMPs presentes en *C. albicans* como DC-SIGN (Cambi et al., 2003), MR, CR o FcγR (Romani et al., 2004) y a que el tratamiento de muerte por calor de *C. albicans* hace que los ligandos de Dectin-1 queden más expuestos en la superficie (Gow et al., 2007; Netea et al., 2006a).

Seguidamente, comprobamos que la estimulación de GM-DCs deficientes en SHIP-1 con HKC se tradujo en una mayor fosforilación de Syk comparada con GM-DCs procedentes de ratones WT. Estos datos concuerdan con datos previos en los que se indica una correlación inversa entre la expresión de SHIP-1 y la fosforilación de Syk (Roes et al., 2003). Puesto que SHIP-1 es una inositol fosfatasa y no debería afectar directamente a la fosforilación en tirosina de Syk, es posible que los dominios SH2 de SHIP-1 y Syk compitan por la unión a la tirosina 15 del hemITAM una vez fosforilada (Conde et al., 2011) (Figura D1. A).

HIPÓTESIS DE COMPETENCIA SHIP-1/SYK

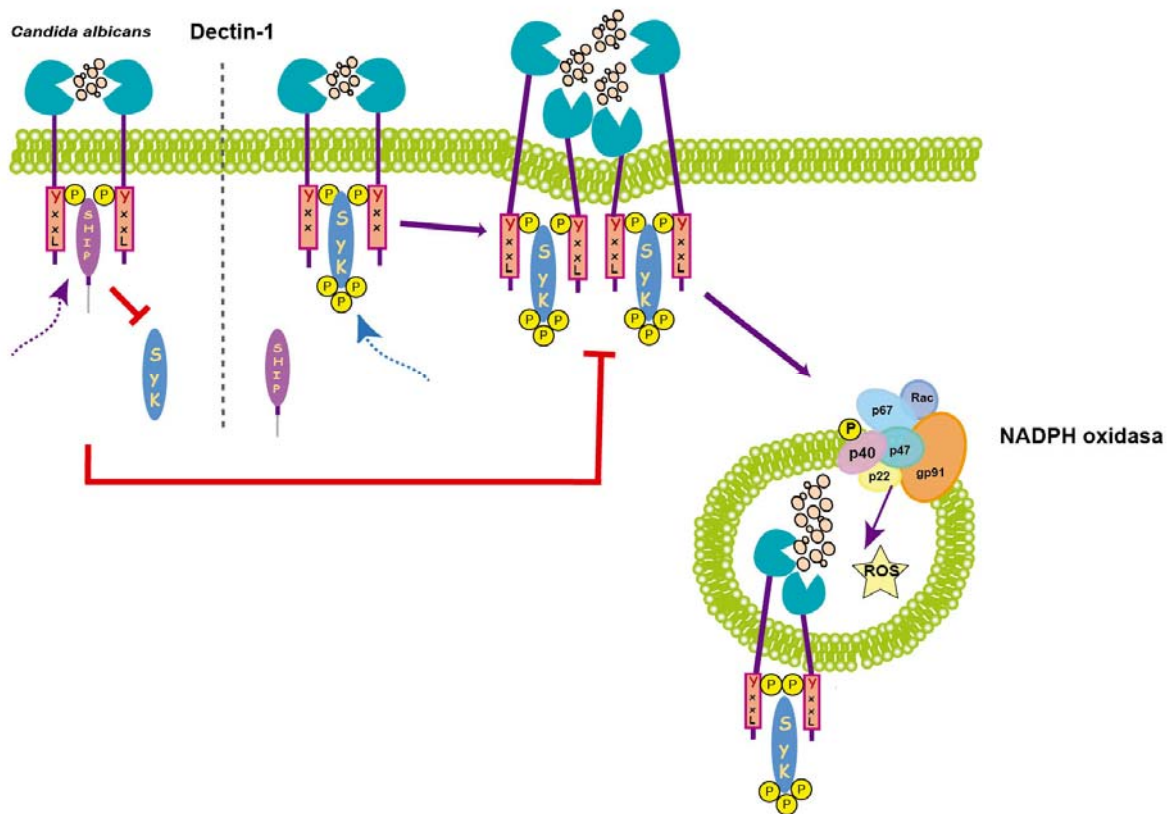


Figura D1. Hipótesis de competencia entre SHIP-1 y Syk para la unión al hemITAM de Dectin-1.

SHIP-1 se une al hemITAM fosforilado en tirosina 15 inhibiendo la unión de Syk y la señalización vía Dectin-1/Syk o si se da la unión de Syk impide la unión de SHIP-1. Tras su fosforilación de Syk es reclutamiento junto con Dectin-1 y NADPH oxidasa al fagosoma donde tiene lugar la producción de ROS

Esta competición entre dominios SH2 por una fosfo-tirosina ha sido propuesta para explicar el papel regulador negativo de SHIP-1 en la unión de Grb2 a fosfo-Shc, resultando en una inhibición de la actividad Ras tras la unión del receptor de la célula B y FcγRIIB (Tridandapani et al., 1998). SHIP-1 también compite de forma similar con PI3K por la unión al dominio ITAM fosforilado de DAP12, limitando así las respuestas funcionales de TREM-2 (Peng et al., 2010)..

Una hipótesis alternativa sería que la fosfo-tirosina 15 estaría ocurriendo secuencialmente en el tiempo (Figura D2) de un modo similar al descrito en la “sinapsis fagocítica” (Goodridge et al., 2011), ya que la relocalización de SHIP-1 en fagosomas es detectada de manera temprana tras la estimulación, mientras que la fosforilación de Syk alrededor de fagosomas que contienen HKC no se observa

hasta pasados 15 minutos tras la estimulación. Alternativamente, la ausencia de la actividad fosfatasa de SHIP-1 podría resultar en activación de otros efectores que actúan en un nivel posterior y que podrían potenciar indirectamente la activación y fosforilación del hemITAM independientemente de Syk (Mócsai et al., 2010)

HIPÓTESIS DE UNIÓN SECUENCIAL

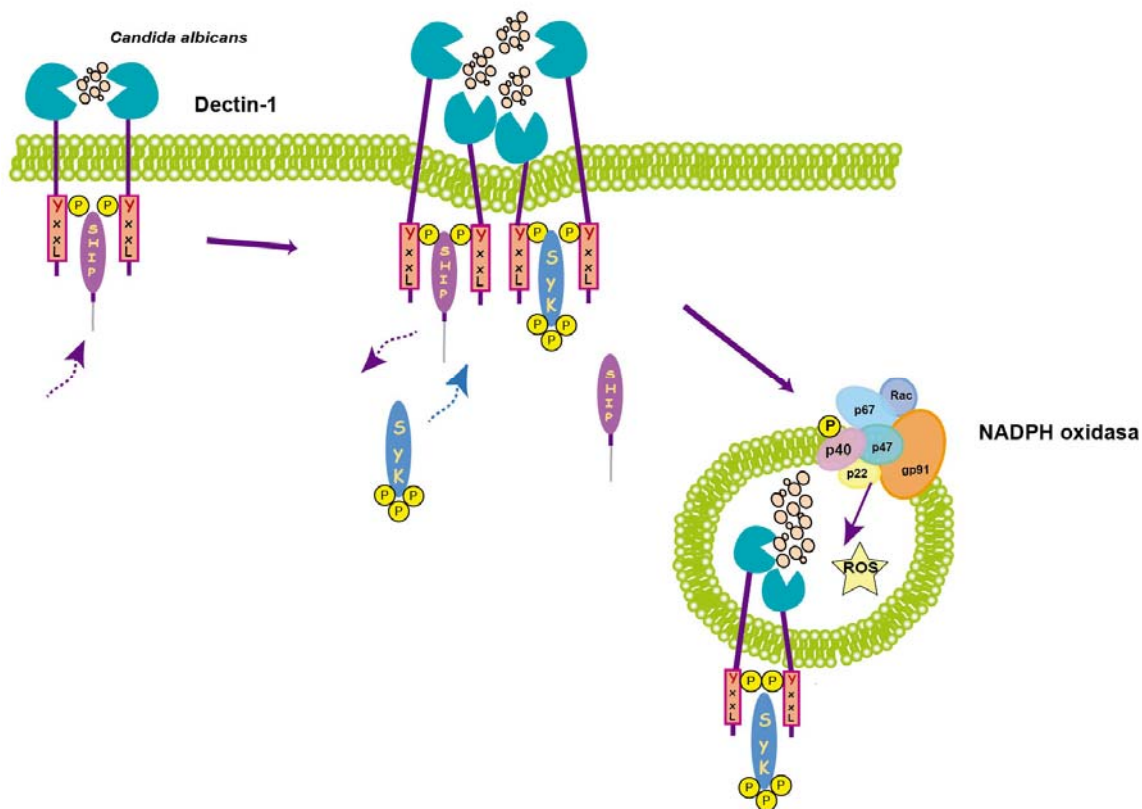


Figura D2. Hipótesis de unión secuencial de SHIP-1 y Syk para la unión al hemITAM de Dectin-1.

La unión de SHIP-1 al hemITAM de Dectin-1 fosforilado en tirosina 15 o se produce de manera transitoria, dando lugar posteriormente a la unión y fosforilación de Syk, activación de NADPH oxidasa y producción de ROS.

A pesar de la mayor fosforilación de Syk en ausencia de SHIP-1 (Figura D3), no hemos encontrado mayor activación de las vías de señalización posteriores y factores de transcripción, incluyendo MAPKs, NF- κ B o NFAT, no afectando la producción de citoquinas. Sin embargo, observamos una mayor producción de ROS en GM-DCs deficientes en SHIP-1 en respuesta a HKC. Esta mayor producción de ROS es dependiente de Dectin-1, puesto que el bloqueo con laminarina reduce los niveles de la producción de ROS, igualando los niveles en

GM-DCs deficientes en SHIP-1 y WT. Sin embargo, todavía existe una producción de ROS que estaría mediada por otros receptores. Se ha descrito que la generación de ROS para eliminación de *C. albicans* vía Dectin-1 es dependiente de Syk (Underhill et al., 2005) y nuestros datos empleando el inhibidor de Syk, R406, lo confirman. Además, componentes de la NADPH oxidasa como Gp91phox y p40phox han sido implicados en la producción de ROS mediada por Dectin-1 (Ma et al., 2012; Tam et al., 2014a). Sin embargo, los mecanismos exactos que permiten la activación de NADPH oxidasa y producción de ROS tras la activación de Dectin-1/Syk no han sido establecidos. En consonancia con esto, la producción de ROS observada fue dependiente de NADPH oxidasa y esta mayor producción de ROS en GM-DCs deficientes en SHIP-1 va acompañada de una mayor activación de la subunidad p40phox de NADPH oxidasa.

Las células inmunes innatas deben ser capaces de distinguir entre la unión directa a microbios y la detección de componentes desprendidos de la superficie de microbios situados a distancia, para iniciar respuestas celulares antimicrobianas como fagocitosis o producción de ROS cuando sean necesarias. Uno de los mecanismos propuestos para este control refinado es la acción de fosfatasa de receptor CD45 y CD148. La interacción de Dectin-1 con β -glucanos particulados, pero no solubles, promueve una “sinapsis fagocítica” en la que las fosfatasas CD45 y CD148 son requeridas inicialmente para la desfosforilación de Lyn, una quinasa de la familia Src, en su tirosina inhibidora (Y507), facilitando la fosforilación del hemITAM, pero son seguidamente excluidas del sitio de contacto de la partícula de β -glucano permitiendo así la asociación y señalización de Syk. (Goodridge et al., 2011). De esta manera, la activación de la sinapsis fagocítica se produce sólo en presencia directa del patógeno y activa mecanismos de inflamación más potentes. Nuestros resultados sugieren que SHIP-1 realiza una regulación fina de la respuesta a través de Dectin-1, de manera que inhibe selectivamente algunos mecanismos que requieren de más control como la producción de ROS procedentes del eje Dectin-1/Syk/NADPH oxidasa. De acuerdo con nuestros resultados, la producción de ROS en respuesta a *Saccharomyces cerevisiae* está acompañada de una mayor fosforilación de Syk y P40phox (Ma et al., 2014). Otra posible hipótesis es que SHIP-1, además pueda estar actuando a otros niveles, por ejemplo sobre la PI3K. De hecho, se ha sugerido un papel para la activación de

PI3K in la generación de ROS en respuesta a β -glucanos o *Aspergillus fumigatus* (Boyle et al., 2011; Shah et al., 2009) donde SHIP-1 podría regular el balance de efectores en la vía PI3K activada a continuación de Syk.

MODELO EN AUSENCIA DE SHIP-1

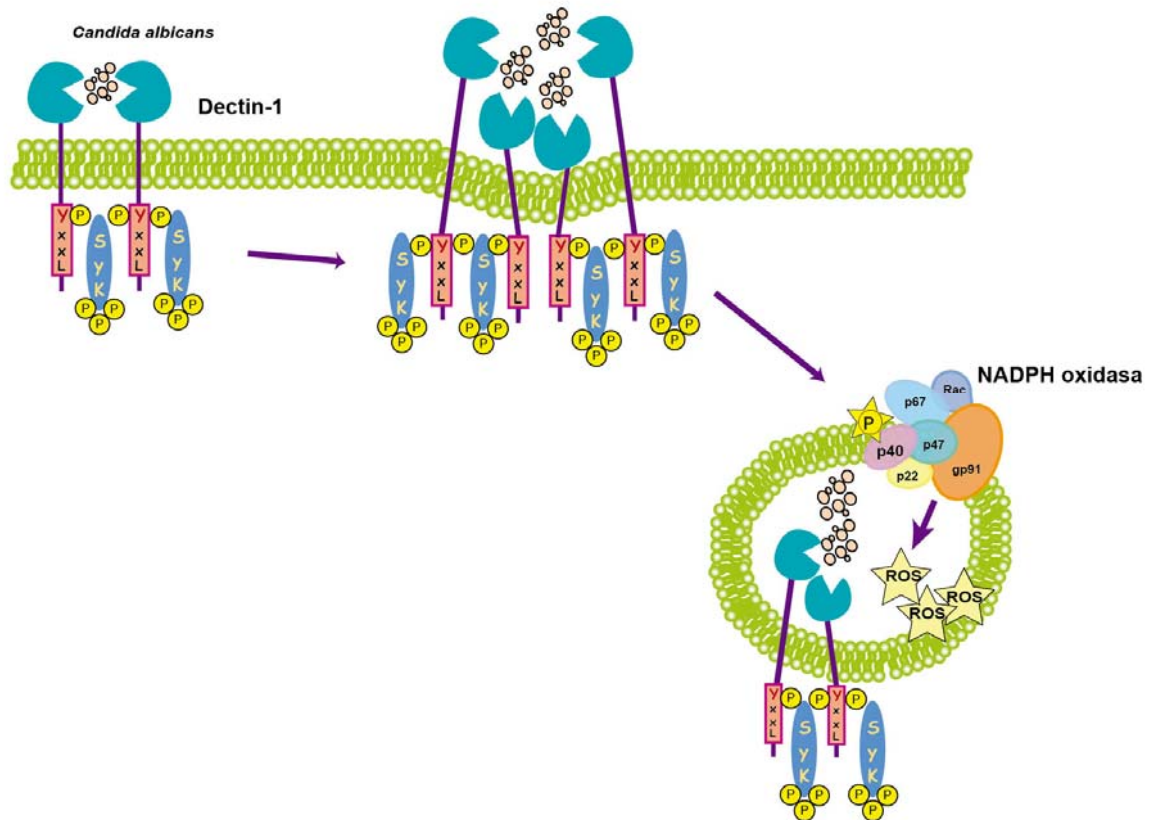


Figura D3. Modelo de señalización vía el heMITAM de Dectin-1 en ausencia de SHIP-1.

En ausencia de SHIP-1, se produce una incrementada fosforilación de Syk y de la subunidad p40phox de NADPH oxidasa y en consecuencia una mayor producción de ROS.

Es importante destacar que esta mayor producción de ROS vía Dectin-1/Syk/NADPH oxidasa en GM-DCs deficientes en SHIP-1, se tradujo en una mejor eliminación de *C. albicans* en infecciones *in vitro*. En este sentido está bastante establecido que la generación de ROS en fagosomas mediada por Dectin-1 de manera dependiente de Syk y NADPH oxidasa tiene un papel fungicida directo en el fagosoma (Gantner et al., 2003; Kennedy et al., 2007; Underhill et al., 2005). De hecho, la incapacidad de neutrófilos procedentes de ratones deficientes en Dectin-1 para activar la NADPH oxidasa y producción de ROS correlaciona con la eficiencia de estos neutrófilos para eliminar *A. fumigatus in vitro* (Werner et al., 2009).

En búsqueda de relevancia fisiológica, decidimos estudiar el papel de SHIP-1 en células dendríticas en modelos murinos de infección e inflamación dependientes de Dectin-1. Se ha descrito que la señalización vía Syk en células dendríticas es esencial para la resistencia a infecciones fúngicas sistémicas (Whitney et al., 2014). Sin embargo, no observamos un papel relevante *in vivo* de SHIP-1 en la señalización vía Dectin-1 en DCs en respuesta a infecciones sistémicas por *C. albicans*, a pesar de la mayor fosforilación de Syk. Tras la infección intravenosa de *C. albicans* en ratones CD11cΔSHIP-1 y WT, observamos idéntica patología y el mismo recuento de CFUs en riñón. Asimismo, la infección intraperitoneal de *C. albicans* mostró un resultado similar, ya que el número de neutrófilos reclutados o la desaparición de macrófagos residentes del peritoneo no se ven afectados. Estos resultados pueden explicarse debido a que las DCs no son tan eficientes como neutrófilos o macrófagos en eliminar *C. albicans* (d'Ostiani et al., 2000; Kelsall et al., 2002; Newman and Holly, 2001).

Puesto que la delección específica de SHIP-1 en DCs no demostró un efecto significativo en el modelo de infección con *C. albicans*, decidimos evaluar el efecto de la delección parcial de SHIP-1 en ratones heterocigotos SHIP-1^{+/-}. Estos ratones SHIP-1^{+/-} aunque presentan una delección parcial de SHIP-1, mostraron un fenotipo parcialmente similar a ratones silvestres en homeostasis, puesto que generalmente no presentan el síndrome mieloproliferativo característico en ratones SHIP-1^{-/-} (Helgason et al., 1998). Cuando evaluamos el efecto de la delección parcial de SHIP en ratones SHIP-1^{+/-}, encontramos un mayor reclutamiento de neutrófilos al peritoneo y reducción en el número de macrófagos residentes en respuesta a la inyección de Curdlan intraperitoneal, un modelo dependiente de Dectin-1 (Rosas et al., 2008). Ambas poblaciones muestran una delección parcial de SHIP-1 y tanto neutrófilos como macrófagos son las principales poblaciones involucradas en la eliminación temprana de microorganismos y en la producción de ROS (Lefkowitz et al., 1996; Li et al., 2011a; Majer et al., 2012; Marchi et al., 2013; Miramon et al., 2012; Miramon et al., 2013; Silva, 2009; Werner et al., 2009). Por este motivo, es posible que el papel de SHIP-1 en la señalización vía Dectin-1 sea más relevante en los tipos celulares que expresan Dectin-1 y donde la producción de ROS tiene un papel fundamental para eliminación de *C. albicans*. Una posibilidad sería analizar el papel de SHIP-1 en macrófagos alveolares residentes (CD11c⁺) puesto

que se ha descrito que son importantes en la defensa de infecciones fúngicas (Parti et al., 2010). Para ello emplearíamos un modelo de infección de *C. albicans* intranasal (Londono et al., 1998) en los ratones CD11c Δ SHIP-1. También podría estudiarse el papel de SHIP-1 en macrófagos y neutrófilos de ratones LysM Δ SHIP-1 en un modelo de candidiasis sistémica. Estas son algunas de las direcciones en las que estamos investigando en la actualidad.

En conclusión, nuestro estudio muestra que tras la estimulación de Dectin-1 con β -glucanos, presentes en la pared de hongos como *C. albicans*, SHIP-1 se une a la tirosina 15 fosforilada presente en el hemITAM de Dectin-1. En este contexto, SHIP-1 regula la activación de Syk y de NADPH oxidasa, modulando selectivamente la producción de ROS. Sin embargo, no podemos descartar que SHIP-1 además pueda estar actuando a otros niveles, por ejemplo regulado el balance de efectores en la vía PI3K activada por debajo de Syk. Funcionalmente, la delección de SHIP-1 confiere a las DCs una mayor capacidad de producción de ROS y eliminación de *C. albicans* de manera dependiente de Dectin-1/Syk/NADPH oxidasa. Nuestros resultados establecen una asociación entre SHIP-1 y la fosforilación del hemITAM que modula la activación NADPH oxidasa mediada por Dectin-1/Syk de manera no redundante y demuestran que la fosfatasa SHIP-1 antagoniza selectivamente ciertas vías efectoras promovidas por Dectin-1. Nuestros datos ilustran por tanto, la complejidad de la señalización de CLRs mieloides, donde el hasta ahora considerado hemITAM activador puede también acoplar fosfatasas para selectivamente regular ciertos procesos como producción de ROS.

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

Primera: El proteoma asociado a la cadena de Dectin-1 fosforilada en tirosina no sólo contiene quinasas como Syk, Lyn o Hck, sino también fosfatasas como SHP-1, SHP-2 y SHIP-1. SHIP-1 es la proteína más representada en el proteoma asociado a la cadena de Dectin-1 fosforilada en el hemITAM.

Segunda: SHIP-1 interacciona directamente con la tirosina fosforilada en posición 15 de la cadena citoplasmática de Dectin-1.

Tercera: SHIP-1 co-localiza con Dectin-1 en el fagosoma que contiene zymosan de manera dependiente de la tirosina 15 de Dectin-1.

Cuarta: Syk se hiperfosforila tras la estimulación de DCs deficientes en SHIP-1 con *C. albicans* muerta por calor.

Quinta: La ausencia de SHIP-1 en DCs no afecta la fagocitosis de *C. albicans* muerta por calor, así como la activación dependiente de Syk de rutas de señalización que activan MAPK, los factores de transcripción NF- κ B o NFAT, o la producción de citoquinas.

Sexta: En respuesta a *C. albicans* muerta por calor, la fosfatasa SHIP-1 regula de manera selectiva la activación de NADPH oxidasa y la producción de ROS de manera dependiente de Dectin-1 en DCs.

Séptima: La deficiencia de SHIP-1 en DCs resulta en una mayor eliminación de *C. albicans in vitro*, que es dependiente de Dectin-1, de la activación de Syk y NADPH y de la producción de ROS.

Octava: La deficiencia de SHIP-1 en DCs no contribuye a una mejor respuesta a la infección sistémica por *C. albicans in vivo*.

Novena: La deficiencia parcial de SHIP-1 en ratones heterocigotos afecta al reclutamiento de neutrófilos en un modelo de inflamación peritoneal dependiente de Dectin-1.

BIBLIOGRAFÍA

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
- Aman, M.J., Walk, S.F., March, M.E., Su, H.P., Carver, D.J., and Ravichandran, K.S. (2000). Essential role for the C-terminal noncatalytic region of SHIP in FcγRIIB1-mediated inhibitory signaling. *Mol Cell Biol* **20**, 3576-3589.
- Antignano, F., Ibaraki, M., Kim, C., Ruschmann, J., Zhang, A., Helgason, C.D., and Krystal, G. (2010a). SHIP is required for dendritic cell maturation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **184**, 2805-2813.
- Antignano, F., Ibaraki, M., Ruschmann, J., Jagdeo, J., and Krystal, G. (2010b). SHIP negatively regulates Flt3L-derived dendritic cell generation and positively regulates MyD88-independent TLR-induced maturation. *Journal of leukocyte biology*.
- Ariizumi, K., Shen, G.L., Shikano, S., Xu, S., Ritter, R., Kumamoto, T., Edelbaum, D., Morita, A., Bergstresser, P.R., and Takashima, A. (2000). Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* **275**, 20157-20167.
- Ashman, R.B., Fulurija, A., and Papadimitriou, J.M. (1996). Strain-dependent differences in host response to *Candida albicans* infection in mice are related to organ susceptibility and infectious load. *Infection and immunity* **64**, 1866-1869.
- Belz, G.T., and Nutt, S.L. (2012). Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* **12**, 101-113.
- Beutler, B.A. (2009). TLRs and innate immunity. *Blood* **113**, 1399-1407.
- Boyle, K.B., Gyori, D., Sindrilariu, A., Scharffetter-Kochanek, K., Taylor, P.R., Mocsai, A., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (2011). Class IA phosphoinositide 3-kinase beta and delta regulate neutrophil oxidase activation in response to *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J Immunol* **186**, 2978-2989.
- Brown, A.J., and Gow, N.A. (1999). Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* **7**, 333-338.
- Brown, G.D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* **6**, 33-43.
- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A., Levitz, S.M., Netea, M.G., and White, T.C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* **4**, 165rv113.
- Brown, G.D., and Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**, 36-37.
- Brown, G.D., Taylor, P.R., Reid, D.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Martinez-Pomares, L., Wong, S.Y.C., and Gordon, S. (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* **196**, 407-412.
- Cambi, A., and Figdor, C. (2009). Necrosis: C-type lectins sense cell death. *Curr Biol* **19**, R375-378.
- Cambi, A., Gijzen, K., de Vries I, J., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G.J., Netea, M.G., Kullberg, B.J., Romani, L., and Figdor, C.G. (2003). The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *European journal of immunology* **33**, 532-538.

- Carvalho, A., Giovannini, G., De Luca, A., D'Angelo, C., Casagrande, A., Iannitti, R.G., Ricci, G., Cunha, C., and Romani, L. (2012). Dectin-1 isoforms contribute to distinct Th1/Th17 cell activation in mucosal candidiasis. *Cellular & molecular immunology* 9, 276-286.
- Caton, M.L., Smith-Raska, M.R., and Reizis, B. (2007). Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8⁺ dendritic cells in the spleen. *J Exp Med* 204, 1653-1664.
- Clarke, E.V., and Tenner, A.J. (2014). Complement modulation of T cell immune responses during homeostasis and disease. *Journal of leukocyte biology*.
- Coggeshall, K.M. (1998). Inhibitory signaling by B cell Fc gamma RIIB. *Current opinion in immunology* 10, 306-312.
- Collazo, M.M., Paraiso, K.H.T., Park, M.-Y., Hazen, A.L., and Kerr, W.G. (2012). Lineage extrinsic and intrinsic control of immunoregulatory cell numbers by SHIP. *European Journal of Immunology*.
- Collazo, M.M., Wood, D., Paraiso, K.H., Lund, E., Engelman, R.W., Le, C.T., Stauch, D., Kotsch, K., and Kerr, W.G. (2009). SHIP limits immunoregulatory capacity in the T-cell compartment. *Blood* 113, 2934-2944.
- Conde, C., Gloire, G., and Piette, J. (2011). Enzymatic and non-enzymatic activities of SHIP-1 in signal transduction and cancer. *Biochem Pharmacol* 82, 1320-1334.
- Condé, C., Gloire, G., and Piette, J. (2011). Enzymatic and non-enzymatic activities of SHIP-1 in signal transduction and cancer. *Biochemical pharmacology* 82, 1320-1334.
- Cox, D., Dale, B.M., Kashiwada, M., Helgason, C.D., and Greenberg, S. (2001). A regulatory role for Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) in phagocytosis mediated by Fc gamma receptors and complement receptor 3 (alpha(M)beta(2); CD11b/CD18). *The Journal of experimental medicine* 193, 61-71.
- d'Ostiani, C.F., Del Sero, G., Bacci, A., Montagnoli, C., Spreca, A., Mencacci, A., Ricciardi-Castagnoli, P., and Romani, L. (2000). Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine* 191, 1661-1674.
- Dale, D.C., Boxer, L., and Liles, W.C. (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112, 935-945.
- Damen, J.E., Ware, M.D., Kalesnikoff, J., Hughes, M.R., and Krystal, G. (2001). SHIP's C-terminus is essential for its hydrolysis of PIP3 and inhibition of mast cell degranulation. *Blood* 97, 1343-1351.
- del Fresno, C., Soulat, D., Roth, S., Blazek, K., Udalova, I., Sancho, D., Ruland, J., and Ardavin, C. (2013). Interferon-beta Production via Dectin-1-Syk-IRF5 Signaling in Dendritic Cells Is Crucial for Immunity to *C. albicans*. *Immunity* 38, 1176-1186.
- Dennehy, K.M., Ferwerda, G., Faro-Trindade, I., Pyz, E., Willment, J.A., Taylor, P.R., Kerrigan, A., Tsoni, S.V., Gordon, S., Meyer-Wentrup, F., *et al.* (2008). Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur. J. Immunol.* 38, 500-506.
- Dong, S., Corre, B., Foulon, E., Dufour, E., Veillette, A., Acuto, O., and Michel, F. (2006). T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2. *J Exp Med* 203, 2509-2518.
- Donini, M., Zenaro, E., Tamassia, N., and Dusi, S. (2007). NADPH oxidase of human dendritic cells: role in *Candida albicans* killing and regulation by interferons, dectin-1 and CD206. *Eur J Immunol* 37, 1194-1203.
- Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *The Journal of biological chemistry* 263, 9557-9560.

- Drickamer, K. (1989). Demonstration of carbohydrate-recognition activity in diverse proteins which share a common primary structure motif. *Biochemical Society transactions* 17, 13-15.
- Drickamer, K. (1993). Evolution of Ca²⁺-dependent animal lectins. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 45, 207-232.
- Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Curr Opin Struc Biol* 9, 585-590.
- Drummond, R.A., Saijo, S., Iwakura, Y., and Brown, G.D. (2011). The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *European journal of immunology* 41, 276-281.
- Dupré-Crochet, S., Erard, M., and Nüße, O. (2013). ROS production in phagocytes: why, when, and where? *Journal of Leukocyte Biology* 94, 657-670.
- Elsori, D.H., Yakubenko, V.P., Roome, T., Thiagarajan, P.S., Bhattacharjee, A., Yadav, S.P., and Cathcart, M.K. (2011). Protein kinase Cdelta is a critical component of Dectin-1 signaling in primary human monocytes. *J Leukoc Biol* 90, 599-611.
- Elward, K., and Gasque, P. (2003). "Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol Immunol* 40, 85-94.
- Fernandes, S., Iyer, S., and Kerr, W.G. (2013). Role of SHIP1 in cancer and mucosal inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1280, 6-10.
- Forestell, S.P., Bohnlein, E., and Rigg, R.J. (1995). Retroviral end-point titer is not predictive of gene transfer efficiency: implications for vector production. *Gene therapy* 2, 723-730.
- Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 7, 1250-1257.
- Fuller, G.L.J., Williams, J.A.E., Tomlinson, M.G., Eble, J.A., Hanna, S.L., Pöhlmann, S., Suzuki-Inoue, K., Ozaki, Y., Watson, S.P., and Pearce, A.C. (2007). The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade. *J Biol Chem* 282, 12397-12409.
- Gales, A., Conduche, A., Bernad, J., Lefevre, L., Olganier, D., Beraud, M., Martin-Blondel, G., Linas, M.D., Auwerx, J., Coste, A., and Pipy, B. (2010). PPARgamma controls Dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 6, e1000714.
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., and Underhill, D.M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *The Journal of experimental medicine* 197, 1107-1117.
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., and Underhill, D.M. (2005). Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J* 24, 1277-1286.
- Geier, S.J., Algate, P.A., Carlberg, K., Flowers, D., Friedman, C., Trask, B., and Rohrschneider, L.R. (1997). The human SHIP gene is differentially expressed in cell lineages of the bone marrow and blood. *Blood* 89, 1876-1885.
- Geijtenbeek, T.B., and Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 9, 465-479.
- Geijtenbeek, T.B.H., van Vliet, S.J., Engering, A., 't Hart, B.A., and van Kooyk, Y. (2004). Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 22, 33-54.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.

- Ghansah, T., Paraiso, K.H.T., Highfill, S., Despons, C., May, S., McIntosh, J.K., Wang, J.-W., Ninos, J., Brayer, J., Cheng, F., *et al.* (2004). Expansion of myeloid suppressor cells in SHIP-deficient mice represses allogeneic T cell responses. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) **173**, 7324-7330.
- Goodridge, H.S., Reyes, C.N., Becker, C.A., Katsumoto, T.R., Ma, J., Wolf, A.J., Bose, N., Chan, A.S.H., Magee, A.S., Danielson, M.E., *et al.* (2011). Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature* **472**, 471-475.
- Goodridge, H.S., Shimada, T., Wolf, A.J., Hsu, Y.-M.S., Becker, C.A., Lin, X., and Underhill, D.M. (2009). Differential use of CARD9 by Dectin-1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* **182**, 1146-1154.
- Goodridge, H.S., Simmons, R.M., and Underhill, D.M. (2007). Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* **178**, 3107-3115.
- Goodridge, H.S., and Underhill, D.M. (2008). Fungal Recognition by TLR2 and Dectin-1. *Handbook of experimental pharmacology*, 87-109.
- Gow, N.A., Netea, M.G., Munro, C.A., Ferwerda, G., Bates, S., Mora-Montes, H.M., Walker, L., Jansen, T., Jacobs, L., Tsoni, V., *et al.* (2007). Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis* **196**, 1565-1571.
- Gow, N.A., van de Veerdonk, F.L., Brown, A.J., and Netea, M.G. (2011a). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* **10**, 112-122.
- Gow, N.A., van de Veerdonk, F.L., Brown, A.J., and Netea, M.G. (2011b). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* **10**, 112-122.
- Gringhuis, S.I., Den Dunnen, J., Litjens, M., Van Der Vlist, M., Wevers, B., Bruijns, S.C.M., and Geijtenbeek, T.B.H. (2009). Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol* **10**, 203-213.
- Gringhuis, S.I., Wevers, B.A., Kaptein, T.M., van Capel, T.M.M., Theelen, B., Boekhout, T., de Jong, E.C., and Geijtenbeek, T.B.H. (2011). Selective C-Rel activation via Malt1 controls anti-fungal T(H)-17 immunity by dectin-1 and dectin-2. *PLoS Pathog* **7**, e1001259.
- Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schäfer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Förster, I., and Ruland, J. (2006). Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **442**, 651-656.
- Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hanneschläger, N., Endres, S., Hartmann, G., Tardivel, A., Schweighoffer, Tybulewicz, *et al.* (2009). Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* **459**, 433-436.
- Hamilton, M.J., Ho, V.W., Kuroda, E., Ruschmann, J., Antignano, F., Lam, V., and Krystal, G. (2011). Role of SHIP in cancer. *Experimental hematology* **39**, 2-13.
- Hazen, A.L., Smith, M.J., Despons, C., Winter, O., Moser, K., and Kerr, W.G. (2009). SHIP is required for a functional hematopoietic stem cell niche. *Blood* **113**, 2924-2933.
- Hector, R.F., Domer, J.E., and Carrow, E.W. (1982). Immune responses to *Candida albicans* in genetically distinct mice. *Infection and immunity* **38**, 1020-1028.
- Heinsbroek, S.E., Taylor, P.R., Rosas, M., Willment, J.A., Williams, D.L., Gordon, S., and Brown, G.D. (2006). Expression of functionally different dectin-1 isoforms by murine macrophages. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) **176**, 5513-5518.

- Helgason, C.D., Damen, J.E., Rosten, P., Grewal, R., Sorensen, P., Chappel, S.M., Borowski, A., Jirik, F., Krystal, G., and Humphries, R.K. (1998). Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes & Development* 12, 1610-1620.
- Hernanz-Falcon, P., Arce, I., Roda-Navarro, P., and Fernandez-Ruiz, E. (2001). Cloning of human DECTIN-1, a novel C-type lectin-like receptor gene expressed on dendritic cells. *Immunogenetics* 53, 288-295.
- Hernanz-Falcón, P., Joffre, O., Williams, D.L., and Reis e Sousa, C. (2009). Internalization of Dectin-1 terminates induction of inflammatory responses. *Eur J Immunol* 39, 507-513.
- Hise, A.G., Tomalka, J., Ganesan, S., Patel, K., Hall, B.A., Brown, G.D., and Fitzgerald, K.A. (2009). An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell host & microbe* 5, 487-497.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L.C., Korn, J.M., Young, R.A., Lander, E.S., and Hacohen, N. (2001). The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science (New York, N.Y.)* 294, 870-875.
- Huber, M., Helgason, C.D., Damen, J.E., Liu, L., Humphries, R.K., and Krystal, G. (1998). The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11330-11335.
- Hughes, C.E., Pollitt, A.Y., Mori, J., Eble, J.A., Tomlinson, M.G., Hartwig, J.H., O'Callaghan, C.A., Fütterer, K., and Watson, S.P. (2010). CLEC-2 activates Syk through dimerization. *Blood* 115, 2947-2955.
- Huysamen, C., and Brown, G.D. (2009). The fungal pattern recognition receptor, Dectin-1, and the associated cluster of C-type lectin-like receptors. *FEMS microbiology letters* 290, 121-128.
- Huysamen, C., Willment, J.A., Dennehy, K.M., and Brown, G.D. (2008). CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *J Biol Chem* 283, 16693-16701.
- Iborra, S., Izquierdo, H.M., Martinez-Lopez, M., Blanco-Menendez, N., Reis, E.S.C., and Sancho, D. (2012). The DC receptor DNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice. *J Clin Invest* 122, 1628-1643.
- Ishihara, H., Sasaoka, T., Hori, H., Wada, T., Hirai, H., Haruta, T., Langlois, W.J., and Kobayashi, M. (1999). Molecular cloning of rat SH2-containing inositol phosphatase 2 (SHIP2) and its role in the regulation of insulin signaling. *Biochemical and biophysical research communications* 260, 265-272.
- Ishii, and Akira (2008). Potential link between the immune system and metabolism of nucleic acids. *Curr Opin Immunol*.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327, 291-295.
- Janeway, C.A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13.
- Janeway, C.A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology today* 13, 11-16.
- Kashiwada, M., Cattoretti, G., McKeag, L., Rouse, T., Showalter, B.M., Al-Alem, U., Niki, M., Pandolfi, P.P., Field, E.H., and Rothman, P.B. (2006). Downstream of tyrosine kinases-1 and Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase are required for regulation of CD4+CD25+ T cell development. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176, 3958-3965.

- Kawasaki, N., Kawasaki, T., and Yamashina, I. (1983). Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *Journal of biochemistry* 94, 937-947.
- Kelsall, B.L., Biron, C.A., Sharma, O., and Kaye, P.M. (2002). Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nature immunology* 3, 699-702.
- Kennedy, A.D., Willment, J.A., Dorward, D.W., Williams, D.L., Brown, G.D., and DeLeo, F.R. (2007). Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol* 37, 467-478.
- Kerr, W.G. (2011). Inhibitor and activator: dual functions for SHIP in immunity and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1217, 1-17.
- Kerr, W.G., Park, M.-Y., Maubert, M., and Engelman, R.W. (2011). SHIP deficiency causes Crohn's disease-like ileitis. *Gut* 60, 177-188.
- Kerrigan, A.M., and Brown, G.D. (2010). Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs. *Immunol Rev* 234, 335-352.
- Koncz, G., Toth, G.K., Bokonyi, G., Keri, G., Pecht, I., Medgyesi, D., Gergely, J., and Sarmay, G. (2001). Co-clustering of Fcγ and B cell receptors induces dephosphorylation of the Grb2-associated binder 1 docking protein. *European journal of biochemistry / FEBS* 268, 3898-3906.
- Krystal, G. (2000). Lipid phosphatases in the immune system. *Seminars in immunology* 12, 397-403.
- Lamkin, T.D., Walk, S.F., Liu, L., Damen, J.E., Krystal, G., and Ravichandran, K.S. (1997). Shc interaction with Src homology 2 domain containing inositol phosphatase (SHIP) in vivo requires the Shc-phosphotyrosine binding domain and two specific phosphotyrosines on SHIP. *J Biol Chem* 272, 10396-10401.
- Lefèvre, L., Lugo-Villarino, G., Meunier, E., Valentin, A., Olganier, D., Authier, H., Duval, C., Dardenne, C., Bernad, J., Lemesre, J.L., *et al.* (2013). The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*. *Immunity* 38, 1038-1049.
- Lefkowitz, S.S., Gelderman, M.P., Lefkowitz, D.L., Moguilevsky, N., and Bollen, A. (1996). Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by macrophages exposed to myeloperoxidase. *The Journal of infectious diseases* 173, 1202-1207.
- Lehner, T. (1964). SYSTEMIC CANDIDIASIS AND RENAL INVOLVEMENT. *Lancet* 1, 1414-1416.
- Leibundgut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M., Osorio, F., Slack, E., Tsoni, S., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G., Ruland, J., and Reis E Sousa, C. (2007). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8, 630-638.
- Leibundgut-Landmann, S., Osorio, F., Brown, G., and Reis E Sousa, C. (2008). Stimulation of dendritic cells via the Dectin-1 / Syk pathway allows priming of cytotoxic T cell responses. *Blood* 112, 4971-4980.
- Levitz, S.M., and Diamond, R.D. (1985). A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J Infect Dis* 152, 938-945.
- Li, X., Utomo, A., Cullere, X., Choi, M.M., Milner, D.A., Jr., Venkatesh, D., Yun, S.H., and Mayadas, T.N. (2011a). The beta-glucan receptor Dectin-1 activates the integrin Mac-1 in neutrophils via Vav protein signaling to promote *Candida albicans* clearance. *Cell host & microbe* 10, 603-615.
- Li, X., Utomo, A., Cullere, X., Choi, M.M., Milner, D.A., Venkatesh, D., Yun, S.-H., and Mayadas, T.N. (2011b). The β-glucan receptor Dectin-1 activates the integrin Mac-1 in neutrophils via Vav protein signaling to promote *Candida albicans* clearance. *Cell host & microbe* 10, 603-615.

- Lionakis, M.S., Lim, J.K., Lee, C.C.R., and Murphy, P.M. (2011). Organ-Specific Innate Immune Responses in a Mouse Model of Invasive Candidiasis. *Journal of Innate Immunity* 3, 180-199.
- Lionakis, M.S., and Netea, M.G. (2013). Candida and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. *PLoS Pathog* 9, e1003079.
- Liu, L., Damen, J.E., Ware, M.D., and Krystal, G. (1997). Interleukin-3 induces the association of the inositol 5-phosphatase SHIP with SHP2. *The Journal of biological chemistry* 272, 10998-11001.
- Liu, Q., Sasaki, T., Kozieradzki, I., Wakeham, A., Itie, A., Dumont, D.J., and Penninger, J.M. (1999). SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes Dev* 13, 786-791.
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-949.
- Londono, P., Gao, X.M., Bowe, F., McPheat, W.L., Booth, G., and Dougan, G. (1998). Evaluation of the intranasal challenge route in mice as a mucosal model for *Candida albicans* infection. *Microbiology* 144 (Pt 8), 2291-2298.
- Ma, J., Becker, C., Lowell, C.A., and Underhill, D.M. (2012). Dectin-1 triggered recruitment of LC3 to phagosomes facilitates MHC class II presentation of fungal-derived antigens. *Journal of Biological Chemistry*.
- Ma, J., Becker, C., Reyes, C., and Underhill, D.M. (2014). Cutting edge: FYCO1 recruitment to dectin-1 phagosomes is accelerated by light chain 3 protein and regulates phagosome maturation and reactive oxygen production. *J Immunol* 192, 1356-1360.
- Mach, N., Gillessen, S., Wilson, S.B., Sheehan, C., Mihm, M., and Dranoff, G. (2000). Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res* 60, 3239-3246.
- Majer, O., Bourgeois, C., Zwolanek, F., Lassnig, C., Kerjaschki, D., Mack, M., Müller, M., and Kuchler, K. (2012). Type I interferons promote fatal immunopathology by regulating inflammatory monocytes and neutrophils during *Candida* infections. *PLoS Pathogens* 8, e1002811.
- Mansour, M.K., Tam, J.M., Khan, N.S., Seward, M., Davids, P.J., Puranam, S., Sokolovska, A., Sykes, D.B., Dagher, Z., Becker, C., *et al.* (2013). Dectin-1 activation controls maturation of β -1,3-glucan-containing phagosomes. *Journal of Biological Chemistry* 288, 16043-16054.
- Mantegazza, A.R., Barrio, M.M., Moutel, S., Bover, L., Weck, M., Brossart, P., Teillaud, J.L., and Mordoh, J. (2004). CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human immature dendritic cells. *Blood* 104, 1183-1190.
- Marakalala, M.J., Vautier, S., Potrykus, J., Walker, L.A., Shepardson, K.M., Hopke, A., Mora-Montes, H.M., Kerrigan, A., Netea, M.G., Murray, G.I., *et al.* (2013). Differential Adaptation of *Candida albicans* In Vivo Modulates Immune Recognition by Dectin-1. *PLoS Pathogens* 9, e1003315.
- Marchi, L.F., Sesti-Costa, R., Ignacchiti, M.D.C., Chedraoui-Silva, S., and Mantovani, B. (2013). In vitro activation of mouse neutrophils by recombinant human interferon-gamma: Increased phagocytosis and release of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines. *International immunopharmacology* 18, 228-235.
- Martin, B., Hirota, K., Cua, D.J., Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2009). Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* 31, 321-330.
- McGreal, E.P., Martinez-Pomares, L., and Gordon, S. (2004). Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol* 41, 1109-1121.

- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science (New York, N.Y.)* 296, 298-300.
- Mertsching, E., Bafetti, L., Hess, H., Perper, S., Giza, K., Allen, L.C., Negrou, E., Hathaway, K., Hopp, J., Chung, J., *et al.* (2008). A mouse Fcgamma-Fcepsilon protein that inhibits mast cells through activation of FcgammaRIIB, SH2 domain-containing inositol phosphatase 1, and SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatases. *J Allergy Clin Immunol* 121, 441-447 e445.
- Miramon, P., Dunker, C., Windecker, H., Bohovych, I.M., Brown, A.J., Kurzai, O., and Hube, B. (2012). Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. *PLoS one* 7, e52850.
- Miramon, P., Kasper, L., and Hube, B. (2013). Thriving within the host: *Candida* spp. interactions with phagocytic cells. *Med Microbiol Immunol* 202, 183-195.
- Mócsai, A., Ruland, J., and Tybulewicz, V.L.J. (2010). The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 10, 387-402.
- Mukherjee, O., Weingarten, L., Padberg, I., Pracht, C., Sinha, R., Hochdorfer, T., Kuppig, S., Backofen, R., Reth, M., and Huber, M. (2012). The SH2-domain of SHIP1 interacts with the SHIP1 C-terminus: impact on SHIP1/Ig-alpha interaction. *Biochim Biophys Acta* 1823, 206-214.
- Neill, L., Tien, A.H., Rey-Ladino, J., and Helgason, C.D. (2007). SHIP-deficient mice provide insights into the regulation of dendritic cell development and function. *Experimental hematology* 35, 627-639.
- Netea, M.G., Gow, N.A.R., Munro, C.A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., Hobson, R.P., Bertram, G., Hughes, H.B., Jansen, T., *et al.* (2006a). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *The Journal of clinical investigation* 116, 1642-1650.
- Netea, M.G., Gow, N.A.R., Munro, C.A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., Hobson, R.P., Bertram, G., Hughes, H.B., Jansen, T., *et al.* (2006b). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* 116, 1642-1650.
- Newman, S.L., and Holly, A. (2001). *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *Infection and Immunity* 69, 6813-6822.
- Olynych, T.J., Jakeman, D.L., and Marshall, J.S. (2006). Fungal zymosan induces leukotriene production by human mast cells through a dectin-1-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 118, 837-843.
- Ong, C.J., Ming-Lum, A., Nodwell, M., Ghanipour, A., Yang, L., Williams, D.E., Kim, J., Demirjian, L., Qasimi, P., Ruschmann, J., *et al.* (2007). Small-molecule agonists of SHIP1 inhibit the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematopoietic cells. *Blood* 110, 1942-1949.
- Ono, M., Bolland, S., Tempst, P., and Ravetch, J.V. (1996). Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature* 383, 263-266.
- Ono, M., Okada, H., Bolland, S., Yanagi, S., Kurosaki, T., and Ravetch, J.V. (1997). Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell* 90, 293-301.
- Osborne, M.A., Zenner, G., Lubinus, M., Zhang, X., Songyang, Z., Cantley, L.C., Majerus, P., Burn, P., and Kochan, J.P. (1996). The inositol 5'-phosphatase SHIP binds to immunoreceptor signaling motifs and responds to high affinity IgE receptor aggregation. *J Biol Chem* 271, 29271-29278.

- Paraíso, K.H.T., Ghansah, T., Costello, A., Engelman, R.W., and Kerr, W.G. (2007). Induced SHIP deficiency expands myeloid regulatory cells and abrogates graft-versus-host disease. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) *178*, 2893-2900.
- Parguñña, A.F., Alonso, J., Rosa, I., Vélez, P., González-López, M.J., Guitián, E., Ebbel, J.A., Loza, M.I., and García, A. (2012). A detailed proteomic analysis of rhodocytin-activated platelets reveals novel clues on the CLEC-2 signalosome: implications for CLEC-2 signaling regulation. *Blood*.
- Parti, R.P., Loper, R., Brown, G.D., Gordon, S., Taylor, P.R., Bonventre, J.V., Murphy, R.C., Williams, D.L., and Leslie, C.C. (2010). Cytosolic phospholipase $\alpha 2$ activation by *Candida albicans* in alveolar macrophages: role of dectin-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* *42*, 415-423.
- Peng, Q., Malhotra, S., Torchia, J.A., Kerr, W.G., Coggeshall, K.M., and Humphrey, M.B. (2010). TREM2- and DAP12-dependent activation of PI3K requires DAP10 and is inhibited by SHIP1. *Science Signaling* *3*, ra38.
- Pesesse, X., Backers, K., Moreau, C., Zhang, J., Blero, D., Paternotte, N., and Erneux, C. (2006). SHIP1/2 interaction with tyrosine phosphorylated peptides mimicking an immunoreceptor signalling motif. *Advances in enzyme regulation* *46*, 142-153.
- Phee, H., Jacob, A., and Coggeshall, K.M. (2000). Enzymatic activity of the Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase is regulated by a plasma membrane location. *J Biol Chem* *275*, 19090-19097.
- Plato, A., Willment, J.A., and Brown, G.D. (2013). C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. *International Reviews of Immunology* *32*, 134-156.
- Poeck, H., and Ruland, J. (2010). SYK kinase signaling and the NLRP3 inflammasome in antifungal immunity. *Journal of molecular medicine* (Berlin, Germany) *88*, 745-752.
- Rauh, M.J., Ho, V., Pereira, C., Sham, A., Sly, L.M., Lam, V., Huxham, L., Minchinton, A.I., Mui, A., and Krystal, G. (2005). SHIP represses the generation of alternatively activated macrophages. *Immunity* *23*, 361-374.
- Robinson, M.J., Osorio, F., Rosas, M., Freitas, R.P., Schweighoffer, E., Gross, O., Verbeek, J.S., Ruland, J., Tybulewicz, V., Brown, G.D., *et al.* (2009). Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med* *206*, 2037-2051.
- Robson, J.D., Davidson, D., and Veillette, A. (2004). Inhibition of the Jun N-terminal protein kinase pathway by SHIP-1, a lipid phosphatase that interacts with the adaptor molecule Dok-3. *Mol Cell Biol* *24*, 2332-2343.
- Roes, J., Choi, B.K., and Cazac, B.B. (2003). Redirection of B cell responsiveness by transforming growth factor beta receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 7241-7246.
- Rogers, N.C., Slack, E.C., Edwards, A.D., Nolte, M.A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D.L., Gordon, S., Tybulewicz, V.L., Brown, G.D., and Reis e Sousa, C. (2005). Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* *22*, 507-517.
- Rohrschneider, L.R., Fuller, J.F., Wolf, I., Liu, Y., and Lucas, D.M. (2000). Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes & development* *14*, 505-520.
- Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* *11*, 275-288.
- Romani, L., Bistoni, F., and Puccetti, P. (2002). Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol* *10*, 508-514.
- Romani, L., Montagnoli, C., Bozza, S., Perruccio, K., Spreca, A., Allavena, P., Verbeek, S., Calderone, R.A., Bistoni, F., and Puccetti, P. (2004). The exploitation of distinct recognition receptors in

dendritic cells determines the full range of host immune relationships with *Candida albicans*. *International immunology* 16, 149-161.

Rosas, M., Liddiard, K., Kimberg, M., Faro-Trindade, I., McDonald, J.U., Williams, D.L., Brown, G.D., and Taylor, P.R. (2008). The induction of inflammation by dectin-1 in vivo is dependent on myeloid cell programming and the progression of phagocytosis. *J Immunol* 181, 3549-3557.

Ruschmann, J., Ho, V., Antignano, F., Kuroda, E., Lam, V., Ibaraki, M., Snyder, K., Kim, C., Flavell, R.A., Kawakami, T., *et al.* (2010). Tyrosine phosphorylation of SHIP promotes its proteasomal degradation. *Experimental hematology* 38, 392-402, 402.e391.

Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S.-h., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., *et al.* (2007). Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* 8, 39-46.

Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martínez, D., Hernanz-Falcón, P., Rosewell, I., and Reis e Sousa, C. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 458, 899-903.

Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2012). Signaling by Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Homeostasis. *Annu Rev Immunol* 30, 491-529.

Sattler, M., Verma, S., Pride, Y.B., Salgia, R., Rohrschneider, L.R., and Griffin, J.D. (2001). SHIP1, an SH2 domain containing polyinositol-5-phosphatase, regulates migration through two critical tyrosine residues and forms a novel signaling complex with DOK1 and CRKL. *The Journal of biological chemistry* 276, 2451-2458.

Saville, S.P., Lazzell, A.L., Monteagudo, C., and Lopez-Ribot, J.L. (2003). Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* 2, 1053-1060.

Shah, V.B., Ozment-Skelton, T.R., Williams, D.L., and Keshvara, L. (2009). Vav1 and PI3K are required for phagocytosis of beta-glucan and subsequent superoxide generation by microglia. *Molecular Immunology* 46, 1845-1853.

Silva, M.T. (2009). When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol*.

Slack, E.C., Robinson, M.J., Hernanz-Falcón, P., Brown, G.D., Williams, D.L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V.L., and Reis e Sousa, C. (2007). Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan. *Eur J Immunol* 37, 1600-1612.

Sly, L.M., Ho, V., Antignano, F., Ruschmann, J., Hamilton, M., Lam, V., Rauh, M.J., and Krystal, G. (2007). The role of SHIP in macrophages. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12, 2836-2848.

Sly, L.M., Rauh, M.J., Kalesnikoff, J., Buchse, T., and Krystal, G. (2003). SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Experimental hematology* 31, 1170-1181.

Song, M., Kim, M.J., Ha, S., Park, J.B., Ryu, S.H., and Suh, P.G. (2005). Inositol 5'-phosphatase, SHIP1 interacts with phospholipase C-gamma1 and modulates EGF-induced PLC activity. *Experimental & molecular medicine* 37, 161-168.

Spellberg, B., Ibrahim, A.S., Edwards, J.E., Jr., and Filler, S.G. (2005). Mice with disseminated candidiasis die of progressive sepsis. *The Journal of infectious diseases* 192, 336-343.

Steinman, R.M. (2007). Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat Med* 13, 1155-1159.

Steinman, R.M. (2011). Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annual Review of Immunology*.

Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Pillars Article: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 1973. 137: 1142-1162. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 178, 5-25.

Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *The Journal of experimental medicine* 139, 380-397.

Sudbery, P.E. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology* 9, 737-748.

Suzuki-Inoue, K., Fuller, G.L.J., García, A., Eble, J.A., Pöhlmann, S., Inoue, O., Gartner, T.K., Hughan, S.C., Pearce, A.C., Laing, G.D., *et al.* (2006). A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood* 107, 542-549.

Svajger, U., Anderlüh, M., Jeras, M., and Obermajer, N. (2010). C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cellular signalling* 22, 1397-1405.

Takeda, K., and Akira, S. (2003). Toll receptors and pathogen resistance. *Cellular microbiology* 5, 143-153.

Takeshita, S., Namba, N., Zhao, J.J., Jiang, Y., Genant, H.K., Silva, M.J., Brodt, M.D., Helgason, C.D., Kalesnikoff, J., Rauh, M.J., *et al.* (2002). SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts. *Nature medicine* 8, 943-949.

Tam, J.M., Mansour, M.K., Khan, N.S., Seward, M., Puranam, S., Tanne, A., Sokolovska, A., Becker, C.E., Acharya, M., Baird, M.A., *et al.* (2014a). Dectin-1-Dependent LC3 Recruitment to Phagosomes Enhances Fungicidal Activity in Macrophages. *J Infect Dis*.

Tam, J.M., Mansour, M.K., Khan, N.S., Seward, M., Puranam, S., Tanne, A., Sokolovska, A., Becker, C.E., Acharya, M., Baird, M.A., *et al.* (2014b). Dectin-1 dependent LC3 recruitment to phagosomes enhances fungicidal activity in macrophages. *The Journal of infectious diseases*, jiu290.

Tanne, A., Ma, B., Boudou, F., Tailleux, L., Botella, H., Badell, E., Levillain, F., Taylor, M.E., Drickamer, K., Nigou, J., *et al.* (2009). A murine DC-SIGN homologue contributes to early host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 206, 2205-2220.

Tarasenko, T., Kole, H.K., Chi, A.W., Mentink-Kane, M.M., Wynn, T.A., and Bolland, S. (2007). T cell-specific deletion of the inositol phosphatase SHIP reveals its role in regulating Th1/Th2 and cytotoxic responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11382-11387.

Taylor, P.R., Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., and Gordon, S. (2004). The role of SIGNR1 and the beta-glucan receptor (dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. *J Immunol* 172, 1157-1162.

Taylor, P.R., Brown, G.D., Reid, D.M., Willment, J.A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., and Wong, S.Y. (2002). The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 169, 3876-3882.

Taylor, P.R., Tsoni, S.V., Willment, J.A., Dennehy, K.M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordon, S., and Brown, G.D. (2007). Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* 8, 31-38.

Tridandapani, S., Phee, H., Shivakumar, L., Kelley, T.W., and Coggeshall, K.M. (1998). Role of SHIP in FcγRIIb-mediated inhibition of Ras activation in B cells. *Mol Immunol* 35, 1135-1146.

- Tsang, E., Giannetti, A.M., Shaw, D., Dinh, M., Tse, J.K., Gandhi, S., Ho, H., Wang, S., Papp, E., and Bradshaw, J.M. (2008). Molecular mechanism of the Syk activation switch. *The Journal of biological chemistry* 283, 32650-32659.
- Tu, Z., Ninos, J.M., Ma, Z., Wang, J.W., Lemos, M.P., Despons, C., Ghansah, T., Howson, J.M., and Kerr, W.G. (2001). Embryonic and hematopoietic stem cells express a novel SH2-containing inositol 5'-phosphatase isoform that partners with the Grb2 adapter protein. *Blood* 98, 2028-2038.
- Underhill, D.M., Rossmagle, E., Lowell, C.A., and Simmons, R.M. (2005). Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* 106, 2543-2550.
- Vivier, E., and Malissen, B. (2005). Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol* 6, 17-21.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature immunology* 9, 503-510.
- Wang, J.-W., Howson, J.M., Ghansah, T., Despons, C., Ninos, J.M., May, S.L., Nguyen, K.H.T., Toyama-Sorimachi, N., and Kerr, W.G. (2002a). Influence of SHIP on the NK repertoire and allogeneic bone marrow transplantation. *Science (New York, NY)* 295, 2094-2097.
- Wang, J.W., Howson, J.M., Ghansah, T., Despons, C., Ninos, J.M., May, S.L., Nguyen, K.H., Toyama-Sorimachi, N., and Kerr, W.G. (2002b). Influence of SHIP on the NK repertoire and allogeneic bone marrow transplantation. *Science* 295, 2094-2097.
- Weis, W.I., Taylor, M.E., and Drickamer, K. (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunological reviews* 163, 19-34.
- Wen, H., Ting, J.P.-Y., and O'Neill, L.A.J. (2012). A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases-did Warburg miss inflammation? *Nature Immunology* 13, 352-357.
- Werner, J.L., Metz, A.E., Horn, D., Schoeb, T.R., Hewitt, M.M., Schwiebert, L.M., Faro-Trindade, I., Brown, G.D., and Steele, C. (2009). Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of Immunology* 182, 4938-4946.
- Whitney, P.G., Bar, E., Osorio, F., Rogers, N.C., Schraml, B.U., Deddouche, S., LeibundGut-Landmann, S., and Reis e Sousa, C. (2014). Syk signaling in dendritic cells orchestrates innate resistance to systemic fungal infection. *PLoS Pathog* 10, e1004276.
- Willment, J.A., Gordon, S., and Brown, G.D. (2001). Characterization of the human beta -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *The Journal of biological chemistry* 276, 43818-43823.
- Willment, J.A., Marshall, A.S.J., Reid, D.M., Williams, D.L., Wong, S.Y.C., Gordon, S., and Brown, G.D. (2005). The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol* 35, 1539-1547.
- Wisniewski, D., Strife, A., Swendeman, S., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Kavanaugh, W.M., Tempst, P., and Clarkson, B. (1999). A novel SH2-containing phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase (SHIP2) is constitutively tyrosine phosphorylated and associated with src homologous and collagen gene (SHC) in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Blood* 93, 2707-2720.
- Yadav, M., and Schorey, J.S. (2006). The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood* 108, 3168-3175.
- Yogo, K., Mizutamari, M., Mishima, K., Takenouchi, H., Ishida-Kitagawa, N., Sasaki, T., and Takeya, T. (2006). Src homology 2 (SH2)-containing 5'-inositol phosphatase localizes to podosomes, and the

SH2 domain is implicated in the attenuation of bone resorption in osteoclasts. *Endocrinology* **147**, 3307-3317.

Yoneyama, M., and Fujita, T. (2007). RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine & growth factor reviews* **18**, 545-551.

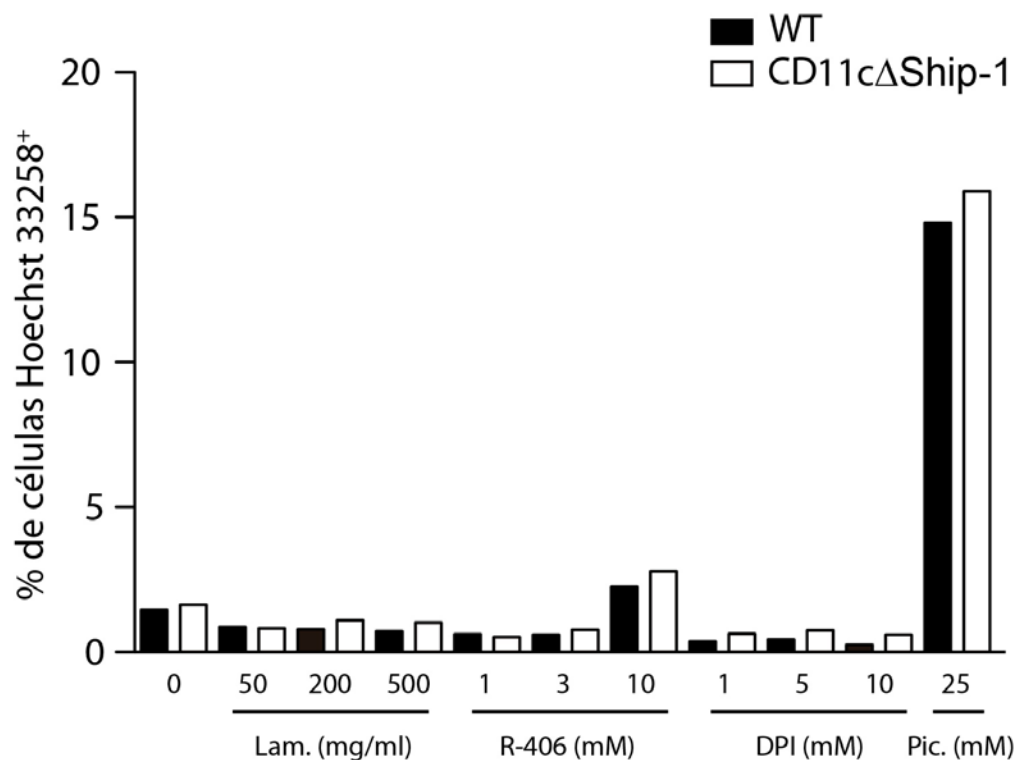
Zelenay, S., Keller, A.M., Whitney, P.G., Schraml, B.U., Deddouche, S., Rogers, N.C., Schulz, O., Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2012). The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *J Clin Invest* **122**, 1615-1627.

Zelensky, A.N., and Gready, J.E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J* **272**, 6179-6217.

ANEXOS

8.- ANEXOS

Anexo 1. Análisis de viabilidad de GM-DCs en respuesta a diferentes de inhibidores químicos.



Anexo 1. Análisis de la viabilidad de GM-DCs en respuesta a diferentes inhibidores químicos.

GM-DCs purificadas de ratones CD11cΔSHIP-1 y ratones WT (wt) fueron tratadas durante tres horas con laminarina, R-406, DPI o Piceatannol a las concentraciones indicadas y comparadas con estas mismas células sin tratar con inhibidores. La viabilidad de estas células fue analizada por la incorporación de Hoechst 33258. En la gráfica se muestran los datos de un experimento representativo de dos.

Anexo 2. Tabla completa de proteínas (CD-ROM)

Tabla completa de proteínas (formato Excel) obtenidas en el apartado 4.1 de resultados.

Anexo 3. Video 1 (CD-ROM)

Video de célula CHO-1 transfectada con las construcciones Dectin-1 WT Cherry y Syk EGFP.

Anexo 4. Video 2 (CD-ROM)

Video de célula CHO-1 transfectada con las construcciones Dectin-1 Y15F Cherry y Syk EGFP.

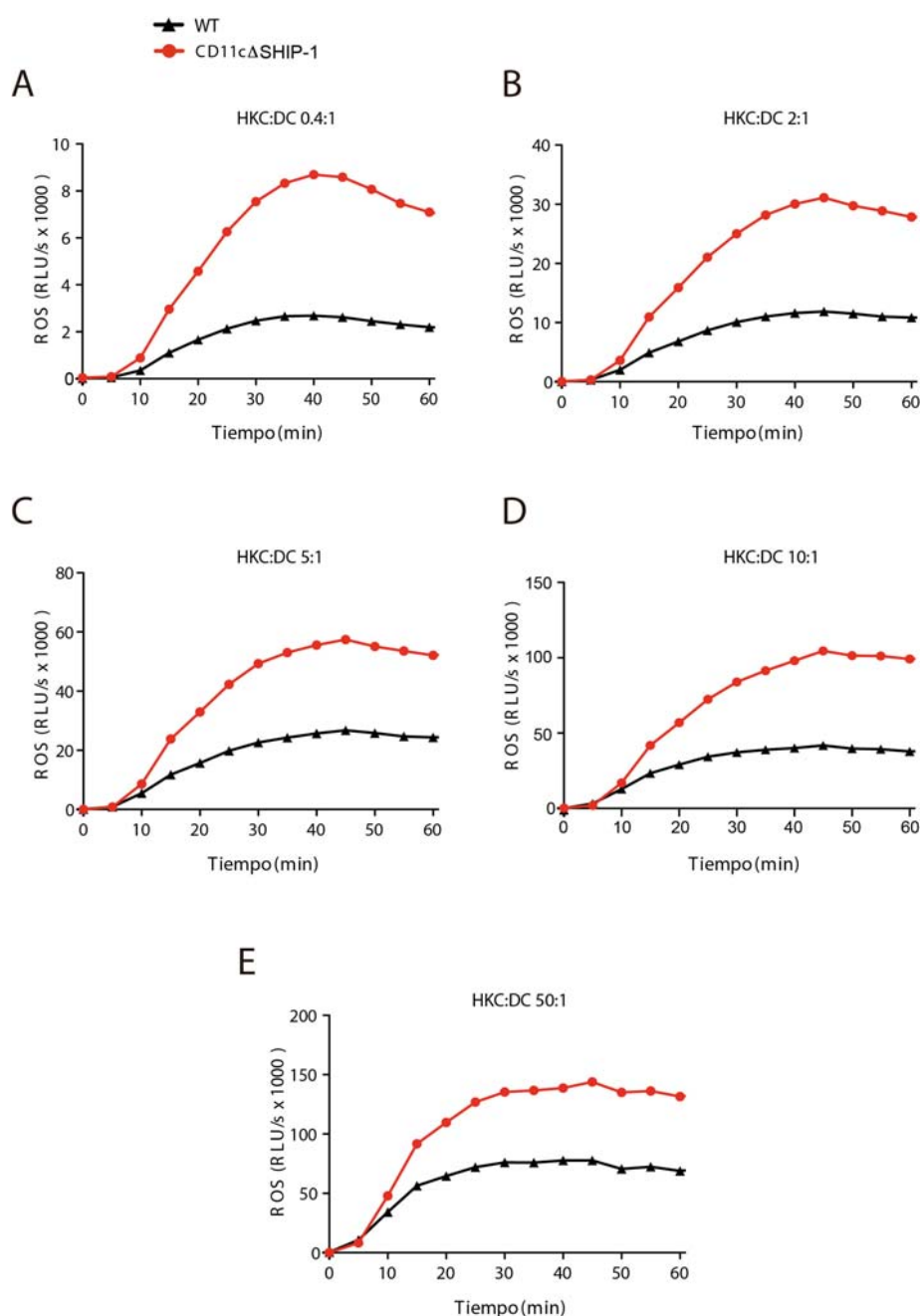
Anexo 5. Video 3 (CD-ROM)

Video de célula CHO-1 transfectada con las construcciones Dectin-1 WT Cherry y SHIP-1 EGFP.

Anexo 6. Video 4 (CD-ROM)

Video de célula CHO-1 transfectada con las construcciones Dectin-1 Y15F Cherry y SHIP-1 EGFP.

Anexo 7. Producción de ROS en GM-DCs WT y deficientes en SHIP-1 en respuesta a distintos ratios HKC: DC.



Anexo 7. Análisis de producción de ROS en respuesta a distintos ratios HKC:DC en GM-DCs deficientes en SHIP-1 y WT.

GM-DCs purificadas de ratones CD11cΔSHIP-1 y ratones WT fueron tratadas con HKC a distintos ratios HKC:DC: 0.4: 1 (A), 2:1 (B), 5:1 (C), 10:1 (D), o 50:1 (E). La producción de ROS fue monitorizada por quimioluminiscencia durante los tiempos indicados y expresada en unidades de luz relativa por segundo (RLU/s). En la figura se muestra un experimento representativo de tres. El eje Y ha sido ajustado a la máxima producción de ROS para cada condición.

